Verteilung von Isoenzymen der Creatinkinase im Menschen
Eine Immunologische Analyse

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

von
Evangelia Jockers
Geb. Wretou

Bochum 1975

Verteilung von Isoenzymen der Creatinkinase im Menschen
Eine Immunologische Analyse

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

von
Evangelia Jockers
Geb. Wretou

Bochum 1975

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546503_0018

Die Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Gerhard Pfleiderer in der Abteilung für Chemie / Lehrstuhl Biochemie der Ruhr-Universität Bochum angefertigt.

Herr Professor Dr. Gerhard Pfleiderer hat mir das Thema überlassen und einen Arbeitsplatz in seinem Lehrstuhl zur Verfügung gestellt. Seine vielseitige unermüdliche Unterstützung und die wertvollen Ratschläge und Diskussionen waren mir eine große Hilfe. Hierfür danke ich ihm sehr herzlich.

Herrn Klaus Grabert gilt mein besonderer Dank für seine ausgezeichnete technische Hilfe bei der Durchführung der Immuntitrationen.

Für die Überlassung von geeignetem Untersuchungsgut danke ich:

Herrn Dr. H. Baumann, Abteilung für Innere Medizin des Krankenhauses Bergmannsheil Bochum;
Herrn Prof. Dr. E. Böhle, Chefarzt der Abteilung für Innere Medizin des Krankenhauses "Augusta" Bochum;
Herrn Dr. E. Böhm, Pathologisches Institut des Krankenhauses Bergmannsheil;
Herrn Dr. W. Klug, Chefarzt der Neuro-Chirurgischen Abteilung des Knappschaftskrankenhauses Bochum-Langendreer;
Frau Prof. Dr. S. Kowalewski, Kinderklinik der Universität Bonn;
Herrn Prof. Dr. Minnigerod, Direktor der HNO-Klinik des Klinikums Essen
Herrn Prof. Dr. W. Müller, Direktor des Pathologischen Instituts des Klinikums Essen;
Herrn Prof. Dr. A. Rosenthal, Chefarzt der Chirurgischen Abteilung des St. Josef-Hospitals Bochum;
Herrn Prof. Dr. Ungeheuer, Chefarzt der Chirurgischen Abteilung des Nordwest-Krankenhauses Frankfurt;
Herrn Prof. Dr. G. Weber, Vorstand der Klinik für Haut-und Geschlechtskrankheiten der Städtischen Krankenanstalten Nürnberg.

INHALTSVERZEICHNIS:

Einleitung 5

TEIL A: ISOLIERUNG DER CREATINKINASEN 10

Isolierung der Creatinkinase aus Skelettmuskel 11
a) Creatinkinase aus Schweinemuskel 11
b) Creatinkinase aus Humanmuskel 15

Isolierung der Creatinkinase aus Gehirn 18
a) Creatinkinase aus Schweinehirn 18
b) Creatinkinase aus Humanhirn 21

Stabilität der Enzympräparationen 24

Isolierung des Hybrids aus humanem Herzmuskel 26

Isolierung der mitochondrialen Creatinkinase aus humanem Herzmuskel 28

TEIL B: IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN 32

Untersuchung der Creatinkinasen vom Schwein 33

Untersuchung der menschlichen Creatinkinasen 39
a) Gelpräzipitation 39
b) Hemmtest 43
c) Immuntitration 45

Diskussion 50

TEIL C: VERTEILUNG DER ISOENZYME DER CREATINKINASE IN MENSCHLICHEN ORGANEN 52

Verteilung in adulten Organen 53

Diskussion 61

Verteilung in foetalen Organen während der Ontogenese 64

Diskussion 80

TEIL D: UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ISOENZYME DER CREATINKINASE IN MENSCHLICHEN TUMOREN UND IN PATHOLOGISCHEN SEREN 82

Isoenzyme der Creatinkinase in menschlichen Tumoren 83

Diskussion 90

Quantitative Bestimmung der Isoenzyme im Serum 91

Diskussion 95

MATERIAL UND METHODEN 97

ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE 110

LITERATURVERZEICHNIS 114

Einleitung

Unterschiedliche Zellen und Zellverbände enthalten eine charakteristische Enzymausrüstung, durch die ihre individuelle und spezifische Funktion gewährleistet wird. Störungen jener Prozesse, die die strukturelle und funktionelle Organisation der Zelle aufrechterhalten, und die mit einer Veränderung der Permeabilität der Zellmembran einhergehen, haben zur Folge, daß zelluläre Enzyme in die Blutbahn gelangen, wo sie das charakteristische Enzymmuster des betroffenen Gewebes widerspiegeln sollten. Ihre Bestimmung im Blut erlaubt daher Rückschlüsse auf die Natur des geschädigten Organs. Die darauf beruhende, sog. Enzymdiagnostik bildet heute einen unentbehrlichen, integrierenden Bestandteil medizinischer Untersuchungsmethoden. Allerdings werden ihr durch eine beschränkte Anzahl organspezifischer Enzyme Grenzen gesetzt.

Die Entdeckung der Existenz verschiedener Formen der Lactatdehydrogenase (PFLEIDERER und JECKEL, 1957) und die Erkenntnis, daß das Verteilungsmuster dieser enzymatischen Formen, der Isoenzyme und Hybriden, organspezifisch ist (PFLEIDERER und WACHSMUTH, 1961), eröffneten neue Aspekte für die Differenzierung von Organen, da sich Organe mit gleichem Enzymgehalt durch ihr spezifisches Isoenzymmuster voneinander unterscheiden lassen. Feine, subtilere Wege zu einer Differentialdiagnose wurden dadurch offenbar.

Seit zehn Jahren ist bekannt, daß auch die Creatinkinase *) (CK, EC. 2.7.3.2), die die reversible Phosphorylierung des Creatins (1), die sog. "Lohmannsche Reaktion" katalysiert (LOHMANN, 1934),

(1) Creatin + ATP $\rightleftharpoons$ Creatinphosphat + ADP

in mehreren Formen auftritt.

---

* Creatinphosphokinase, ATP: Creatinphosphotransferase, ATP: Creatin Transphosphorylase

Die ersten Hinweise hierfür lieferten Untersuchungen von EPPENBERGER et al. (1962/63) über das unterschiedliche Verhalten des Enzyms im Muskel und Gehirn während der Ontogenese des Huhns sowie die Arbeiten der gleichen Gruppe über die Creatinkinase im dystrophischen Skelettmuskel (BURGER et al., 1963). Den endgültigen Beweis für die Existenz von drei Formen der CK in höheren Vertebraten erbrachten unabhängig voneinander DEUL und VAN BREEMEN (1964), SJÖVALL und VOIGT (1964) und BURGER et al. (1964). Nach DAWSON et al. (1965) stellen die einzelnen Formen Dimere dar, die sich aus der Kombination zweier von verschiedenen Genen codierten Untereinheiten, M und B, ergeben. Die resultierenden Formen, CK-MM (Muskeltyp) und CK-BB (Gehirntyp), bilden die reinen Isoenzyme, während das aus verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzte Molekül, CK-MB (Herztyp), ein Hybrid darstellt.

Die drei Formen der Creatinkinase liegen im Cytoplasma löslich vor; CK-MM kann außerdem an strukturelle Einheiten des Muskels gebunden sein (OTTAWAY, 1967). TURNER et al. (1973) konnten vor kurzem nachweisen, daß ein Teil dieses Isoenzyms an Myosin strukturgebunden bzw. mit dem Protein aus dem M-Streifen des Myosins identisch ist. BASKIN und DEAMER (1970) berichteten, daß ein geringer Anteil der CK (1 %) an Fragmenten des sarkoplasmatischen Retikulums gebunden ist. Eine mitochondriale CK (CK_m) wurde von JACOBS et al. (1964) in den Mitochondrien von Herz, Muskel und Gehirn nachgewiesen. Untersuchungen über das partikelgebundene Enzym aus Rinderherz (JACOBS, 1974) lassen vermuten, daß das leicht aggregierende Protein im nativen Zustand ebenfalls als Dimeres vorliegt; über die Natur seiner Untereinheiten ist noch nichts bekannt.

Wie bereits von der Arbeitsgruppe um MEYERHOF (1932) postuliert wurde, liegt die physiologische Bedeutung der Creatinkinase in der Synthese von energiereichem Creatinphosphat als einem Energiespeicher bzw. in der raschen Bereitstellung von ATP bei Bedarf, also im Aufbau eines "ATP-Reservoirs". Nach neueren Untersuchungen kommt dem Creatinphosphat und CK-System

jedoch nicht nur die Bedeutung eines "klassischen" Energiespeichers zu; es scheint auch eine zentrale Rolle im zellulären Energiestoffwechsel einzunehmen. So stimuliert Creatin, ein Endprodukt der Muskelkontraktion, die Synthese von Actin und Meromosin und muß als ein positiver "feed-back"-Effektor der Muskelproteinsynthese angesehen werden (INGWALL et al., 1974). Creatinphosphat hemmt die Phosphofructokinase, ein wichtiges regulatorisches Enzym der Glykolyse, in Bezug auf beide Substrate kompetitiv (KRZANOWSKI und MATSCHINSKY, 1969); dadurch wird ein Mechanismus offenbar, der bei Abnahme der Creatinphosphatkonzentration die Glykolyse aktiviert (STOREY und HOCHACHKA, 1974). Für zwei charakteristische Funktionen des mitochondrialen Enzyms sprechen die Arbeiten von JACOBS et al. (1964) und SWANSON (1967) und insbesondere die weiterführenden Studien von VIAL et al. (1972) und JACOBUS und LEHNINGER (1973): zum einen dient es als Carrier von energiereichen Phosphaten zwischen dem extra- und intramitochondrialen Raum und zum anderen stimuliert es die Atmung durch Bereitstellung von ADP während der Phosphorylierung des Creatins durch ATP. Darüberhinaus wurde ein Zusammenhang mit der membrangebundenen Na^+/K^+-abhängigen ATPase postuliert (WOOD und SWANSON, 1964). Damit könnte das Creatinkinase-System bei gesteigerter mitochondrialer Atmung solche Konzentrationen von ATP bereitstellen, daß der ATP/ADP-Quotient im gesamten Zellraum konstant bleibt. Durch dieses effektive Energiesystem werden Muskel und Nerven während ihrer mechanischen und elektrochemischen Tätigkeit bei optimaler Leistung gehalten (MAKER et al., 1973).

Die wegen ihrer zentralen Stellung im Energiestoffwechsel von Skelett- und Herzmuskulatur besonders hohe Konzentration der CK in diesen beiden Geweben hat zur Folge, daß Herz- und Skelettmuskelschädigungen einen deutlichen Anstieg der CK-Aktivität im Serum bewirken. Die Creatinkinase ist daher seit langem als das Leitenzym für die Diagnostik primärer Myopathien (KAR und PEARSON, 1965) und Herzerkrankungen (HESS et al., 1964) anerkannt. In den letzten Jahren wurde jedoch durch eine kaum noch überschaubare Anzahl von Untersuchungen evident, daß auch andere Erkrankungen und Zustände mit einer Schädigung

der Skelettmuskulatur verlaufen können. Daher darf eine Erhöhung der CK-Aktivität im Serum als die Auswirkung einer Streßsituation auf den gesamten Organismus angesehen werden (VALE et al., 1974).
Während die Bestimmung der Gesamtaktivität der CK im Serum einen festen Platz in der klinischen Routinediagnostik eingenommen hat, wurden Analysen ihrer Isoenzyme nur gelegentlich und qualitativ, z.B. bei Muskeldystrophien, durchgeführt (SHAPIRA, 1970, GOTO und KATSUKI, 1970 und CAO et al., 1971). Die Ursache hierfür ist in dem Umstand zu suchen, daß die konventionellen elektrophoretischen Techniken für eine Analyse der Isoenzyme der CK nicht nur verhältnismäßig unempfindlich, sondern auch recht aufwendig und zeitraubend sind und sich daher kaum für die Routinediagnostik eignen. Die Beobachtung von VAN DER WEEN und WILLEBRANDS (1966), daß der Herztyp, CK-MB, in Seren von Herzinfarktpatienten auftritt, ließ sich durch andere Autoren zunächst nicht bestätigen und wurde daher nicht weiter beachtet. Erst mit dem Befund von KONTTINEN und SOMER (1972) über das spezifische Auftreten des Hybrids bei akutem Herzinfarkt erfuhr die Bedeutung der Isoenzyme der CK für die Diagnose allgemeine Anerkennung; gleichzeitig wurde die Notwendigkeit einer empfindlichen und einfachen Bestimmungsmethode offenbar. Daß geeignete Techniken bisher nicht vorlagen ist die Ursache für den ausgesprochenen Mangel an quantitativen Daten in der Literatur über die Verteilung der Creatinkinasen in humanen Organen oder Geweben.
In den letzten Jahren wurden in zunehmendem Maße immunologische Techniken für die Untersuchung von Enzymen im Rahmen biologischer oder medizinischer Fragestellungen angewendet. In dem hiesigen Arbeitskreis wurden solche Verfahren bereits für die Isoenzyme der Hexokinase (NEUMANN und PFLEIDERER, 1974), der Aldolase (PFLEIDERER et al., 1974) und der Lactatdehydrogenase (BOLL et al., 1974) entwickelt. Auch die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Erarbeitung einer immunologischen Bestimmungsmethode für die Isoenzyme der CK. Der erste Teil gibt über die Reindarstellung der als Antigene verwendeten Isoenzyme CK-MM und CK-BB aus Geweben vom Schwein und vom Menschen

Auskunft und über die Isolierung der anderen Formen der CK, des Hybrids CK-MB und des mitochondrialen Enzyms CK_m. Die immunologischen Untersuchungen an den einzelnen Formen werden im zweiten Teil besprochen. Zwei weitere Teile beschäftigen sich mit Anwendungen der Immuntitration. In Teil C wird das Verteilungsmuster der Isoenzyme in Organen menschlicher Foeten während der Ontogenese dem Verteilungsmuster in Organen von Adulten gegenübergestellt. Über eine erste orientierende Untersuchung der Isoenzyme der CK in Operationsmaterial (Tumoren) wird im vierten Teil berichtet, der mit der quantitativen Bestimmung der Creatinkinasen in Herzinfarktseren schließt.

TEIL A : ISOLIERUNG DER CREATINKINASEN

Isolierung der Creatinkinase aus Skelettmuskel

Nach der Pionierarbeit von MEYERHOF und LOHMANN (1932), bei der die katalytische Wirkung der Creatinkinase in Muskelrohextrakten demonstriert wurde, gelang die Darstellung des Enzyms aus Kaninchenmuskel in kristalliner Form erstmalig der Arbeitsgruppe von KUBY (1953). Seither wurde der Muskeltyp der Creatinkinase von verschiedenen Spezies nach der "klassischen" Methode der Äthanol-Fraktionierung nach KUBY et al. (1954) isoliert. Für die Gewinnung der empfindlichen CK-MM aus dem Skelettmuskel des Schweins und des Menschen erscheinen jedoch moderne, schonendere Verfahren geeigneter.

a) Creatinkinase aus Schweinemuskel

Frischer Skelettmuskel vom Schwein (700 g), von Fett- und Bindegewebe befreit, wurde in kleine Stücke geschnitten und im Sorvall-Omnimixer mit 1450 ml Extraktionspuffer (0,05 M Tris/HCl, pH 8,0, 0,001 M EDTA, 0,010 M KCl und 0,010 M 2-Mercaptoäthanol) homogenisiert. Das Homogenat enthielt neben dem Muskeltyp geringe Mengen an Hybrid, CK-MB, und Spuren des Gehirntyps. Nach zweistündiger Extraktion unter Rühren wurde 30 min bei 25000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen; der klare Rohextrakt enthielt praktisch die gesamte CK-Aktivität des Homogenats (Tab. 1 I.). Nach Zugabe von Ammoniumsulfat (AS) zum Extrakt fiel die Hauptmenge des Enzyms (89%) in dem Bereich zwischen 40- und 75%iger Sättigung. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, in Standardpuffer (Extraktionspuffer ohne KCl) aufgenommen und über Nacht gegen den gleichen Puffer dialysiert.
Das Dialysat (350 ml) wurde an einer Ionenaustauschersäule (590 x 640 mm) von DEAE-A-50 (äquilibriert mit Standardpuffer) aufgetrennt. Nach anfänglichem Waschen der Säule mit Standardpuffer erfolgte die Elution der CK durch Anlegen eines linearen NaCl-Gradienten (bis 0,1 M NaCl; Gesamtvolumen: 4 l). Der Aktivitätsgipfel der CK erschien im Eluat bei einer Konzentration von etwa 0,070 M NaCl (Abb. 1). 91 % der aufgetragenen

Aktivität wurden nach der Chromatographie zurückerhalten, 56% in der Hauptfraktion a) (Fr. 265-295) und 35% in zwei Nebenfraktionen b) (Fr. 220-264 und 296-370). Die Hauptfraktion, die die CK 7,7-fach angereichert enthielt, wurde durch Gelfiltration von geringen Mengen eines nicht identifizierten Proteins mit größerem Molekulargewicht befreit.

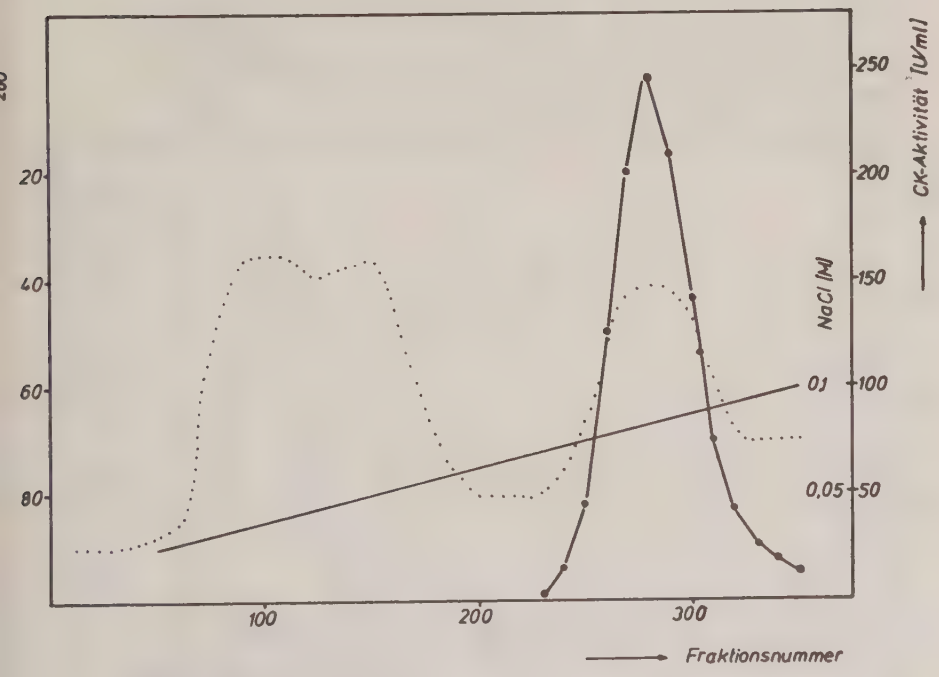


Abb. 1: Anionenaustauscherchromatographie der Creatinkinase aus Schweinemuskel an DEAE Sephadex A-50.
Säule: 590 x 640 mm
Puffer: 0,05 M Tris/HCl, pH 8,0, 0,001 M EDTA und 0,01 M 2-Mercaptoäthanol, Gradient 0,0 - 0,1 M NaCl
Fraktionsvolumen: 10 ml
Durchflußgeschwindigkeit: 25 ml/h
····· T_{280}; ●——● CK-Aktivität (Hinreaktion)

Da sich eine Konzentrierung durch AS-Fällung an dieser Stelle als schädlich erwies, erschien es zweckmäßig, die Fraktion in 4 Portionen zu teilen und diese nach Konzentrierung durch Membranfiltration auf einer Sephadex-G-200 Säule (210 x 1450 mm) zu chromatographieren. Abb. 2 zeigt ein charakteristisches Elutionsdiagramm. In den vereinigten Hauptfraktionen (Tab. 1, IV) wurden 68% der aufgetragenen Aktivität wiedergefunden. Das Gemisch der Nebenfraktionen, das weitere 28% der Ausgangsaktivität enthielt, wurde zusammen mit der Nebenfraktion (b) der Ionenaustauscherchromatographie durch wiederholte Gelfiltration an Sephadex-G-200 weiter gereinigt.

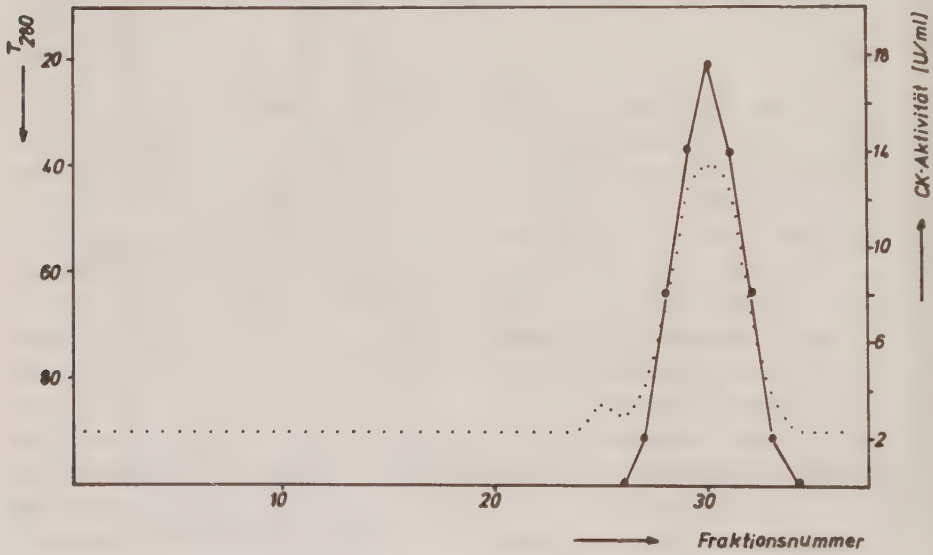


Abb. 2: Gelfiltration von Creatinkinase aus Schweinemuskel an Sephadex-G-200.
Säule: 210 x 1450 mm
Puffer: 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, 0,001 M EDTA, 0,020 M 2-Mercaptoäthanol
Fraktionsvolumen: 10 ml
Durchflußgeschwindigkeit: 15 ml/h
····· T_{280}; •——• CK-Aktivität (Hinreaktion)

Tabelle 1: Isolierung der Creatinkinase aus Schweinemuskel (700 g)

Reinigungsschritt	Volumen (ml)	Gesamtaktivität[1] (U)	Gesamtprotein (mg)	Spezifische Aktivität[1] (U/mg)	Reinigungsfaktor[2]	Ausbeute[3] (%)
I. Rohextrakt	1690	252000	28700	8,8	1	100
II. AS-Fällung (40-75% Sättigung) nach Dialyse	350	207000	15550	13,4	1,5	82
III. Chromatographie an DEAE-Sephadex-A-50	a) 315	116000	1720	67,5	7,7	46
	b) 1125	71300	1780	40	4,5	28
IV. Chromatographie an Sephadex-G-200	a) 99	79000	1130	70	7,9	31
	b) 174	27600	520	53	6,0	11
V. Kristallisation	140	81400 392000[4]	1090	75 375[4]	8,5	32

[1] Test mit Creatin als Substrat.

[2] Die Werte sind bezogen auf die spezifische Aktivität des Rohextraktes.

[3] Die Werte sind bezogen auf die Gesamtaktivität des Rohextraktes.

[4] Test mit Creatinphosphat als Substrat.

In den vereinigten Hauptfraktionen wurde das Enzym durch langsame, über mehrere Tage sich erstreckende AS-Zugabe in Form feiner Nadeln kristallin erhalten. Der Kristallisationspunkt lag bei 55% AS-Sättigung. Zum Vergleich seien die Angaben von KEUTEL et al. (1972) zitiert, denenzufolge das Enzym aus Kalbsmuskel bei 56%iger AS-Sättigung kristallisiert. Die spezifische Aktivität von 75 U/mg (getestet in der Hinreaktion) der ersten Kristalle wurde nach Umkristallisation nicht mehr erreicht; in der endgültigen Kristallsuspension betrug sie 65-70 U/mg. Auch dieser Wert ist vergleichbar mit dem Wert von 60-70 U/mg (bei 30°C) für das Kalbsenzym. Wie aus dem Schema der Enzymdarstellung auf Tab. 1 zu ersehen ist, ließ sich auf die angegebene Weise über ein Gramm an kristallinem Enzym aus 700 g Skelettmuskel isolieren.

b) Creatinkinase aus Humanmuskel

Über die Isolierung und die Eigenschaften der CK aus Humanmuskel berichteten bereits KUMUDAVALLI et al. (1970). Die Arbeiten von KEUTEL et al. (1972) und von WARREN (1973) erschienen während der Durchführung der eigenen Untersuchungen, in deren Verlauf das Enzym, unter der Mitarbeit von Herrn Dr. Gempp-Friedrich, auf die gleiche Weise wie das Enzym aus Schweinemuskel isoliert wurde. Die einzelnen Aufarbeitungsschritte sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt. Das Enzym kristallisierte bei einer AS-Sättigung von 50%; wie aus Tabelle 2 hervorgeht, brachte die fraktionierte AS-Fällung eine bedeutende Anreicherung des Präparates. Die spezifische Aktivität des kristallinen Enzyms (365 U/mg in der Rückreaktion) stimmt mit der von WARREN angeführten gut überein (365 U/mg). KUMUDAVALLI et al. und KEUTEL et al. geben niedrigere Werte an (198 U/mg).

Tabelle 2: Isolierung der Creatinkinase aus Humanmuskel (450 g)

Reinigungsschritt	Volumen (ml)	Gesamtaktivität[1] (U)	Gesamtprotein (mg)	Spezifische Aktivität[1] (U/mg)	Reinigungsfaktor[2]	Ausbeute[3] (%)
I. Rohextrakt	1450	276000	14800	18,5	1	100
II. AS-Fällung (40-75% Sättigung) nach Dialyse	82	221000	6350	35	1,9	80
III. Chromatographie an DEAE-Sephadex-A-50	350	187000	1680	111,5	6,0	68
IV. Chromatographie an Sephadex-G-200	300	165000	975	170	9,2	60
V. Kristallisation	100	105000	288	365 66[4]	19,5	38

[1]Test mit Creatinphosphat

[2]und [3]: siehe Anmerkungen [2]und [3] in Tab. 1

[4]Test mit Creatin als Substrat

Die Gesamtausbeute liegt mit 38% höher als die von KEUTEL et al., aber niedriger als die von WARREN angegebene (60%); in den Arbeiten des letzteren erfolgte die Reindarstellung des Enzyms durch isoelektrische Fokussierung (IEF).

Bei den Untersuchungen zur statistischen Variation der spezifischen Aktivität der kristallinen CK zeigte sich, daß die Streuung der Messungen nicht normal verteilt ist, sondern zwei Maxima aufweist, die um 30% voneinander abweichen. Danach erscheint die Existenz zweier gleichwahrscheinlicher Zustände des Enzyms in Lösung möglich. Ähnliche Beobachtungen für das Enzym aus Kaninchenmuskel wurden früher von CHETVERIKOVA (1971) mitgeteilt. Als Ursache für eine solche Fluktuation der CK werden unterschiedliche Zustände der SH-Gruppen des Enzyms vermutet. Wahrscheinlich lassen sich beide Fluktuationszustände unter bestimmten Bedingungen getrennt erfassen. So fand WARREN bei der IEF zwei Proteingipfel, die sich nur in ihrer spezifischen Aktivität unterschieden (274 und 365 U/mg) und die in der Disk-Elektrophorese aufgetragen, einzeln oder zusammen, eine einzige diskrete Bande ergaben.

Isolierung der Creatinkinase aus Gehirn

Wegen seiner großen Instabilität in Abwesenheit reduzierender Agentien wurde der Gehirntyp CK-BB erst 1963, zehn Jahre nach der Isolierung des Muskeltyps, von WOOD rein dargestellt. Zur Reinigung des Enzyms aus Ochsenhirn führte er die fraktionierte Acetonfällung und die nachfolgende Extraktion des Enzyms mit Magnesiumacetatlösung ein. Bei der Aufarbeitung des Enzyms aus Schweinehirn wurde jedoch festgestellt, daß CK-BB zwar quantitativ von Aceton gefällt wird, sich aber nur schwer (zu 50%) mit Mg-Acetat-Lösung extrahieren läßt. Andererseits erwies sich Aceton als wirksames Detergens bei der Solubilisierung der Gehirnlipide. Daher wurde Aceton nur bis zu der Konzentration zugegeben, bei der CK-BB gerade noch in Lösung bleibt, und nach Zentrifugation des ausgefällten Proteinniederschlags entfernt.

a) Creatinkinase aus Schweinehirn

Ein Kilogramm frisches Schweinehirn wurde in 2 l Extraktionspuffer (0,05 M Tris/HCl, pH 8,0, 0,001 M EDTA, 0,01 M KCl und 0,02 M 2-Mercaptoäthanol) aufgenommen und unter Eiskühlung im Sorvall-Omnimixer portionsweise homogenisiert. Nach mehrstündigem Rühren bei 4°C wurde das Homogenat auf -4°C abgekühlt und tropfenweise mit Aceton versetzt, so daß die Temperatur 0°C dabei nicht überstieg. Die Endkonzentration des Acetons betrug 36% (Unter Berücksichtigung der Volumenkontraktion). Das Gemisch wurde bei 4°C weiter gerührt und anschließend 60 min bei 25000 x g zentrifugiert. Das Sediment, das die mitochondriale CK enthielt, wurde verworfen. Der klare Überstand enthielt nach Entfernen des Acetons an der Wasserstrahlpumpe und nach Zentrifugation der ausgefallenen Proteine noch 74% der Aktivität des Homogenats. Durch die Acetonfällung wurde eine 22-fache Anreicherung des Enzyms erreicht (Tab. 3, II). Es folgte eine fraktionierte AS-Fällung (40-75% Sättigung) des Enzyms im acetonfreien Überstand. Die Fällung wurde wiederholt und das in Standardpuffer (Extraktionspuffer ohne KCl) aufgenommene, dialysierte Präparat an einer mit dem

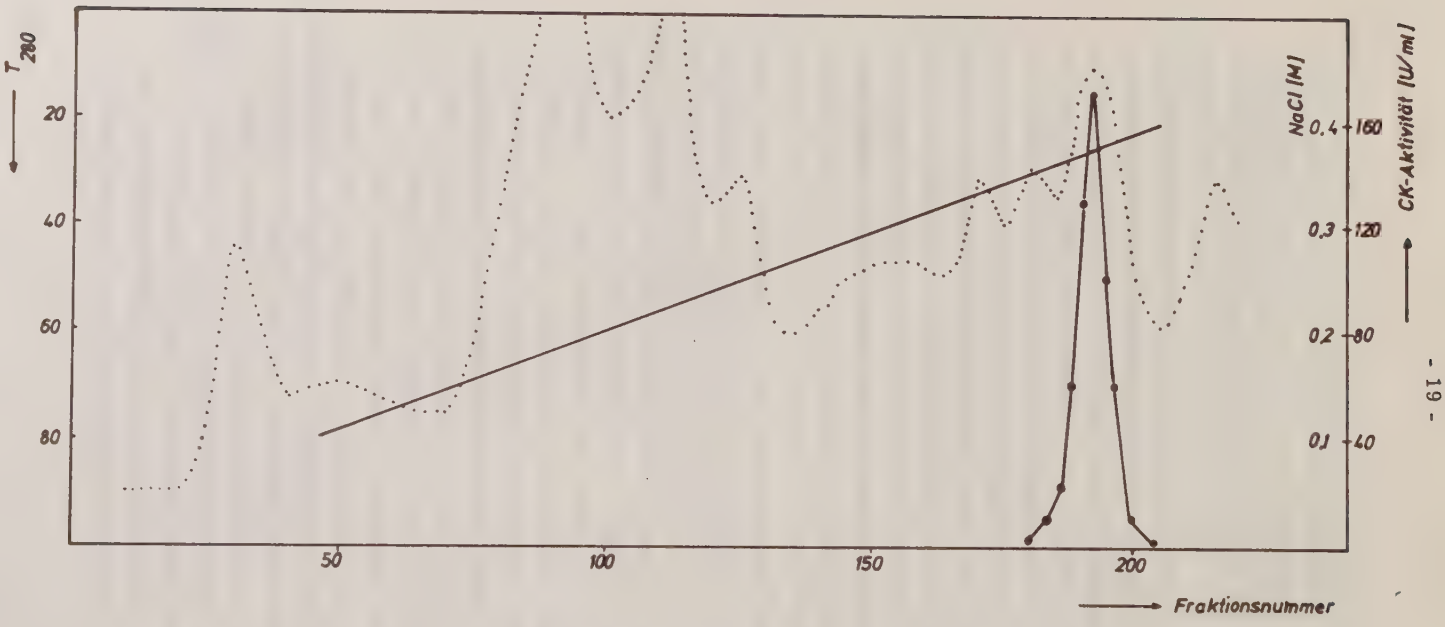


Abb. 3: Anionenaustauscherchromatographie von Creatinkinase aus Schweinehirn an DEAE-Sephadex-G-200.
Säule: 590 x 640 mm
Puffer: 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, 0,001 M EDTA, 0,020 M 2-Mercaptoäthanol
Fraktionsvolumen: 20 ml
mittlere Durchflußgeschwindigkeit: 22 ml/h
.....T_{280}; •——• CK-Aktivität (Hinreaktion)

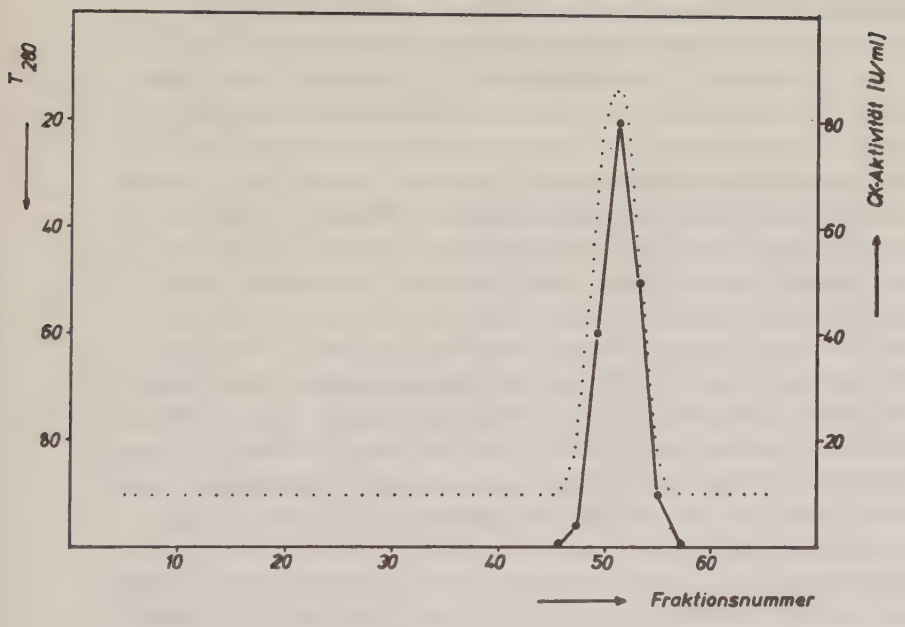


Abb. 4: Gelchromatographie von Creatinkinase aus Schweinehirn an Sephadex-G-200.
Säule: 210 x 1400 mm
Puffer: 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, 0,001 M EDTA und 0,02 M 2-Mercaptoäthanol
Fraktionsvolumen: 5 ml
Durchflußgeschwindigkeit: 15 ml/h
.....T_{280}; •——• CK-Aktivität (Hinreaktion)

gleichen Puffer äquilibrierten Säule (590 x 640 mm) von DEAE-Sephadex-A-50 chromatographiert. Zunächst wurde mit 0,1 M NaCl enthaltendem Standardpuffer bis zum Verschwinden der Absorption bei 280 nm gewaschen und anschließend mit einem linearen Kochsalzgradienten (0,1 - 0,4 M NaCl; Gesamtvolumen: 4 l) eluiert. Der Aktivitätsgipfel der CK erschien bei einer NaCl-Konzentration von 0,35-0,39 M (Abb. 3). Die Hauptfraktionen (Fr. 189 - 194) die 56% der aufgegebenen Aktivität enthielten, wurden vereinigt und langsam mit AS gefällt. Die bis zu einem Sättigungsgrad von 45% Ammoniumsulfat ausgeflockten Verunreinigungen wurden durch Zentrifugation beseitigt; die Hauptmenge des Enzyms fiel scharf bei 47-50% Sättigung. Die Übereinstimmung zwischen Protein- und Aktivitätskurve bei der sich anschließenden Gelchromatographie über eine Sephadex-G-200-Säule (210 x 1400 mm) zeigte, daß das Enzym bereits in weitgehend reiner Form vorliegen mußte. Für die Umkristallisation wurde die überraschende Beobachtung ausgenutzt, nach der das Enzym schlagartig auskristallisierte, wenn die zu 47% mit AS gesättigten Proben vom Eisbad auf Zimmertemperatur gebracht wurden. Die spezifische Aktivität der kristallinen Präparate war in der Hinreaktion 94 U/mg; die Gesamtausbeute betrug 34%. Eine schematische Darstellung der Aufarbeitung ist in Tab. 3 wiedergegeben.

b) Creatinkinase aus Humanhirn

Bei der Aufarbeitung der CK aus Humanhirn wurde festgestellt, daß der Zustand der Organproben für Qualität und Ausbeute der erhaltenen Enzympräparate bestimmend war. Gehirngewebe, das erst mehrere Stunden nach Eintritt des Todes entnommen oder längere Zeit nach der Autopsie bei Normaltemperatur belassen wurde und damit Autolyseprozessen ausgesetzt war, zeigte nicht nur geringe CK-Aktivität, sondern lieferte enzymatisches Material, das sich während der Aufarbeitung als außerordentlich instabil erwies. Bei der in Tabelle 4 schematisch wiedergegebenen Aufarbeitung, die unter Mitarbeit von Herrn Dr. Gempp-Friedrich in Analogie zur Aufarbeitung des

Tabelle 3: Isolierung der Creatinkinase aus Schweinehirn (1000 g)

Reinigungsschritt	Volumen (ml)	Gesamtaktivität[1] (U)	Gesamtprotein (mg)	spezifische Aktivität[1] (U/mg)	Reinigungsfaktor[2]	Ausbeute[3] (%)
I. Homogenat	2800	52500	361000	0,14	1	100
II. Überstand der Acetonfällung (36%)	1660	39400	12750	3	22	75
III. AS-Fällung (40-75% Sättigung nach Dialyse	110	35200	2640	13,3	95	67
IV. Chromatographie an DEAE-Sephadex-A-50	a) 32	19850	252	79,5	560	38
	b) 32	4550	92	49,5	354	9
V. Chromatographie an Sephadex-G-200	205	17700	188	94 310[4]	670	34

1 - 4: siehe Anmerkungen in Tabelle 1

Tabelle 4: Isolierung der Creatinkinase aus Humanhirn (600 g)

Reinigungsschritt	Volumen (ml)	Gesamtaktivität[1] (U)	Gesamtprotein (mg)	spezifische Aktivität[1] (U/mg)	Reinigungsfaktor[2]	Ausbeute[3] (%)
I. Homogenat	2500	90800	310000	0,3	1	100
II. Überstand der Acetonfällung (36%)	1665	38000	10800	3,5	11,8	42
III. AS-Fällung (40-75 % Sättigung) nach Dialyse	175	34500	3740	9,2	31	38
IV. DEAE-Sephadex-A-50 Chromatographie	170	27600	92	300	1000	30
V. Sephadex-G-200 Chromatographie	180	25500	78	327 97[4]	1100	28

1 - 4: siehe Anmerkungen in Tabelle 2

Enzyms vom Schwein durchgeführt wurde, diente als Ausgangsmaterial ein jugendliches Gehirn, das sofort nach der Autopsie zur Verwendung gelangte; es zeigte die außerordentlich hohe CK-Aktivität von 150 U/g Frischgewicht, während die CK-Aktivität im normalen adulten Gehirn nur 55-90 U/g betrug. Aus dem 600 g schweren Gehirn wurden bei einer Ausbeute von 28% 78 mg reine CK-BB mit einer spezifischen Aktivität von 327 U/mg (Rückreaktion) gewonnen. Demgegenüber war im Arbeitskreis von KUBY (KEUTEL et al., 1972) nach der dort üblichen Methode nur die Isolierung von 162 mg kristalliner CK-BB (spezifische Aktivität 262 U/mg) aus 7800 g humanem Gehirn gelungen.

Stabilität der Enzympräparationen

Nach der Beobachtung von KEUTEL et al. (1972) stellt CK-BB aus Humanhirn die labilste aller bis jetzt untersuchten Creatinkinasen dar. Innerhalb von zwei Monaten trat bei dem als AS-Suspension aufbewahrten Enzym ein Aktivitätsverlust um 50% auf, der durch Zentrifugation der Suspension und erneuter Auflösung des Enzymniederschlags in Standardpuffer teilweise rückgängig gemacht werden konnte. In Lösung erwies sich der humane Gehirntyp (0,8 mg/ml), der noch 80% der Aktivität der ursprünglichen kristallinen Präparation enthielt, bei wiederholter Zugabe von 2-Mercaptoäthanol als über mehrere Monate hin haltbar.
Das Isoenzym aus Schweinehirn, das bedeutend weniger empfindlich als das aus Humanhirn ist, war in Lösung ebenfalls stabiler als in Suspension; dieser Unterschied machte sich jedoch erst nach längerer Zeit bemerkbar. Nach zweijähriger Lagerung wies das gelöste Enzym 64% Restaktivität auf, während die Aktivität einer ebenso lange aufbewahrten Suspension auf 38% gesunken war. In eingefrorenem Zustand ließ sich das Isoenzym längere Zeit ohne Aktivitätsverlust aufbewahren. Zwar war nach dem Auftauen jeweils nur eine geringe Aktivität vorhanden, jedoch konnte sie durch Zugabe von Mercaptoäthanol innerhalb von 60 min rekonstituiert werden. Die Reaktivierungsrate für das Isoenzym aus Humangewebe war bei gleichartiger Behandlung

viel geringer. Von den in 0,02 M mercaptoäthanolhaltigem Puffer aufbewahrten Muskelisoenzymen war CK-MM vom Schwein ebenfalls stabiler als das humane Muskelenzym, das nach einer Lagerungszeit von zwei Jahren in Suspension 52% und in Lösung 56% Restaktivität besaß. Nach Chromatographie über Sephadex-G-200, wobei Proteine mit niedrigerem Molekulargewicht (Dissoziationsprodukte?) abgetrennt wurden, erreichte das Enzym wieder 70% der ursprünglichen spezifischen Aktivität. Die Reaktivierbarkeit des suspendierten Enzyms wurde nicht untersucht.

Werden die Ergebnisse der Isolierungen der 4 Isoenzyme miteinander verglichen, so fallen die zwischen den Isoenzymen aus Muskel und aus Gehirn bestehenden Ähnlichkeiten auf. Trotz der unterschiedlichen Ausgangsmaterialien (frisches Gewebe von geschlachteten Tieren und humanes Autopsiegewebe) waren die erzielten Aktivitätsausbeuten annähernd gleich. Sowohl die Muskelisoenzyme als auch die Gehirnisoenzyme vom Schwein und vom Menschen besitzen gleiche spezifische Aktivitäten. Das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten in der Hin- und Rückreaktion beträgt sowohl beim Muskeltyp vom Schwein (67:375) als auch bei CK-MM vom Menschen (66:365) 1:5,6. Von ROTTHAUWE und KOWALEWSKI (1967) wird eine um den Faktor 6 höhere Umsatzzahl der Rückreaktion des Muskeltyps angegeben. Bei den Gehirnisoenzymen beträgt das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten 1:3,3 (94:310 U/mg für CK-BB vom Schwein und 97:327 U/mg für das humane Isoenzym). Damit zeigt der Gehirntyp, CK-BB, unter identischen Testbedingungen in der Hinreaktion (Synthese von Creatinphosphat) eine um den Faktor 1,5 höhere und in der Rückreaktion eine um 0,9 niedrigere spezifische Aktivität als der Muskeltyp. Daß KEUTEL et al. eine um den Faktor 2 höhere Umsatzzahl der Gehirnisoenzyme in beiden Richtungen angeben, ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß in ihrem Test in der Rückreaktion keine optimalen Bedingungen für den Muskeltyp vorlagen. Man darf annehmen, daß dem Unterschied in den Aktivitäten der zwei Formen der Creatinkinase eine physiologische Bedeutung zukommt.

Die kristallinen Enzympräparate, die nach den beschriebenen Verfahren gewonnen wurden, waren nach elektrophoretischen

Kriterien frei von anderen Proteinen; sie wurden zum größten Teil als Antigene für die Immunisierung von kleineren Tieren (Puten und Kaninchen) verwendet; größere Tiere (Ziegen und Schafe) wurden von Herrn Dr. Würzburg, Darmstadt, immunisiert.

Isolierung des Hybrids aus humanem Herzmuskel

Das Hybrid CK-MB, dessen immunologische Reaktionsfähigkeit mit Antikörpern gegen die nativen Isoenzyme untersucht werden sollte, wurde nicht künstlich hybridisiert, sondern nativ aus Humanherz isoliert. Zwei adulte, von Fettgewebe befreite humane Herzen wurden zerkleinert und mit dem für die Aufarbeitung von CK-BB benutzten Extraktionspuffer homogenisiert (1:4 Gewicht/Volumen). Nach Zentrifugation (30 min, 25000 x g) wurde im sehr lipidhaltigen Überstand eine fraktionierte AS-Fällung durchgeführt, um zu einer konzentrierten, fettfreien Präparation zu gelangen. Die Fraktion zwischen 25 und 45% Sättigung enthielt 35% der Aktivität des Rohextraktes und neben den drei löslichen Formen der CK den Hauptanteil des mitochondrialen Enzyms; sie wurde daher zu seiner Isolierung weiterverwendet. Anteile aller vier Creatinkinasen befanden sich auch in der von 45-75% gesättigten AS-Fraktion. Zur Auftrennung der multiplen Formen wurde letztere unter den gleichen Bedingungen wie bei der Isolierung des Gehirntyps an DEAE-Sephadex-A-50 chromatographiert. Abbildung 5 zeigt das Elutionsdiagramm. Bezogen auf die nach der Chromatographie erhaltene Gesamtaktivität, die 80% der aufgegebenen Aktivität betrug, zeigte das Eluat folgende Zusammensetzung: 88% CK-MM, 10% CK-MB und 2% CK-BB. Die so gewonnene, von den reinen Isoenzymen befreite, sonst jedoch nicht weiter gereinigte Hybrid-Präparation zeigte eine spezifische Aktivität von 6,3 U/mg (Hinreaktion) bzw. 25 U/mg (Rückreaktion). In konzentrierten Lösungen war CK-MB als Hybrid einige Monate haltbar; in verdünnten Lösungen wurde dagegen eine Dissoziation in die molekularen Formen der reinen Isoenzyme innerhalb weniger Stunden beobachtet. Von ähnlichem Verhalten des künstlich erzeugten Hybrids berichten KEUTEL et al. (1972).

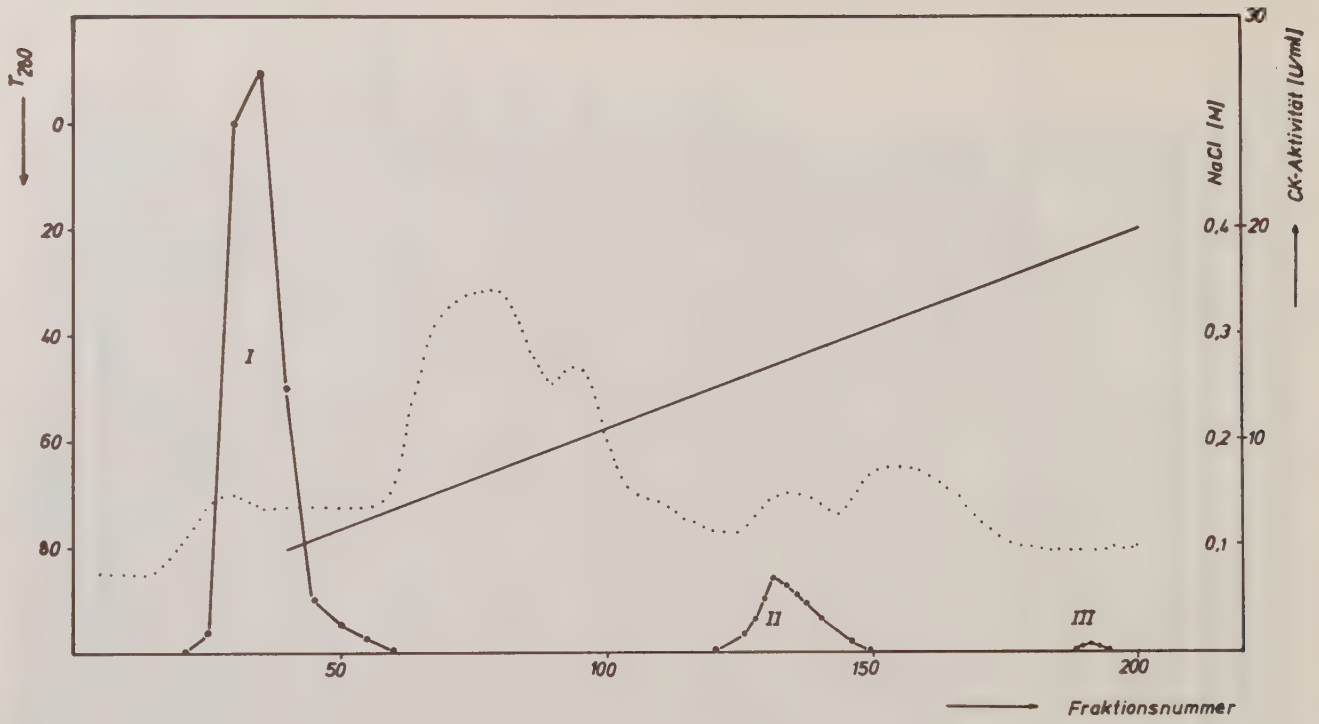


Abb. 5: Anionenaustauscherchromatographie des Rohextraktes aus Humanherz an DEAE-Sephadex-G-200 (Fr. 45-75%iger AS-Sättigung)
Säule: 590 x 640 mm
Puffer: siehe Abbildung 3
Fraktionsvolumen: 20 ml
Durchflußgeschwindigkeit: 25 ml/h
I: CK-MM; II: CK-MB; III: CK-BB
.....T_{280}; •——• CK-Aktivität (Hinreaktion)

Isolierung der mitochondrialen Creatinkinase aus humanem Herzmuskel

Nach den neuesten Befunden von FARRELL et al. (1972) sowie von JACOBUS und LEHNINGER (1973) ist die Creatinkinase aus Rinderherzmitochondrien an der äußeren Seite der inneren mitochondrialen Membran locker gebunden. Die Darstellung des humanen Enzyms aus mit Hilfe der Differentialzentrifugation gewonnenen Mitochondrien erschien daher bei dem vorliegenden Ausgangsmaterial (eingefrorenes Autopsiegewebe) aussichtslos. Statt dessen ließ sich CK_m, die durch elektrophoretische Wanderung zur Kathode gekennzeichnet ist, durch fraktionierte AS-Fällung im Herzextrakt anreichern (s.oben). Sie fiel zum größten Teil bei 25-45%iger AS-Sättigung, während die Hauptmenge der löslichen Creatinkinasen erst bei höheren AS-Konzentrationen ausgefällt wurde. Aus der lipidreichen AS-Suspension wurde das Enzym mit KCl-haltigem Phosphatpuffer (0,02 M, pH 7,2, 1 M KCl, 0,001 M EDTA und 0,02 M 2-Mercaptoäthanol) vollständig extrahiert. Bei der elektrophoretischen Untersuchung des Extraktes trat CK als Doppelbande auf (Abb. 6 "Ausgang"), was auf verschiedene Formen des Enzyms schließen ließ und die Untersuchung des Gemisches auf Sephadex-G-200 veranlaßte. Wie die Abb. 7 zeigt, erschien das mitochondriale Enzym über den größten Teil des Eluats verschmiert mit einem deutlichen Aktivitätsgipfel (I), der einem Molekulargewicht von ca. 250000 entspricht; die cytoplasmatischen CK-MM und CK-MB, die beide ein MG von 80000 besitzen, erschienen im Gipfel III. Ein kleiner Aktivitätsgipfel (II), der von den löslichen Formen frei war, stellt wahrscheinlich einen kleineren Aggregationszustand des mitochondrialen Enzyms dar (Abb. 6 und 7). Die Gipfel I und II enthalten, in der Hinreaktion getestet, 66 % der Gesamtaktivität des Eluats (107 U); in der Rückreaktion entfallen dagegen von 317 U nur 33% auf das mitochondriale Enzym. Das Verhältnis der Aktivitäten in der Hin- und Rückreaktion beträgt für CK_m 1:1,5, für die löslichen Creatinkinasen des Gipfels III 1:5,7. Diese Beobachtung könnte der biologischen Bedeutung der Enzyme entgegenkommen: die physiologische

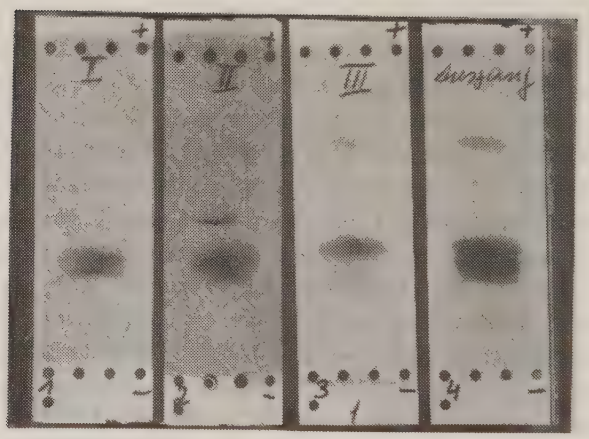


Abb. 6: Abtrennung der mitochondrialen CK von den löslichen Formen durch Gelchromatographie an Sephadex-G-200. Elektrophorese auf Celluloseacetat-Folien der Fraktionen vor und nach der Gelfiltration. "Ausgang": Fraktion zwischen 25 und 45%iger AS-Sättigung im Herzrohsaft (nach Extraktion mit KCl-haltigem Phosphatpuffer). Das Gemisch enthält CK-MB, CK-MM und das mitochondriale Enzym als Doppelbande.
Fraktionen I, II und III: Proben der entsprechenden Aktivitätsgipfel im Eluat nach der Gelchromatographie (vgl. Abb. 7).
I und II enthalten die mitochondriale Form; III weist die löslichen Formen CK-MM und CK-MB auf.

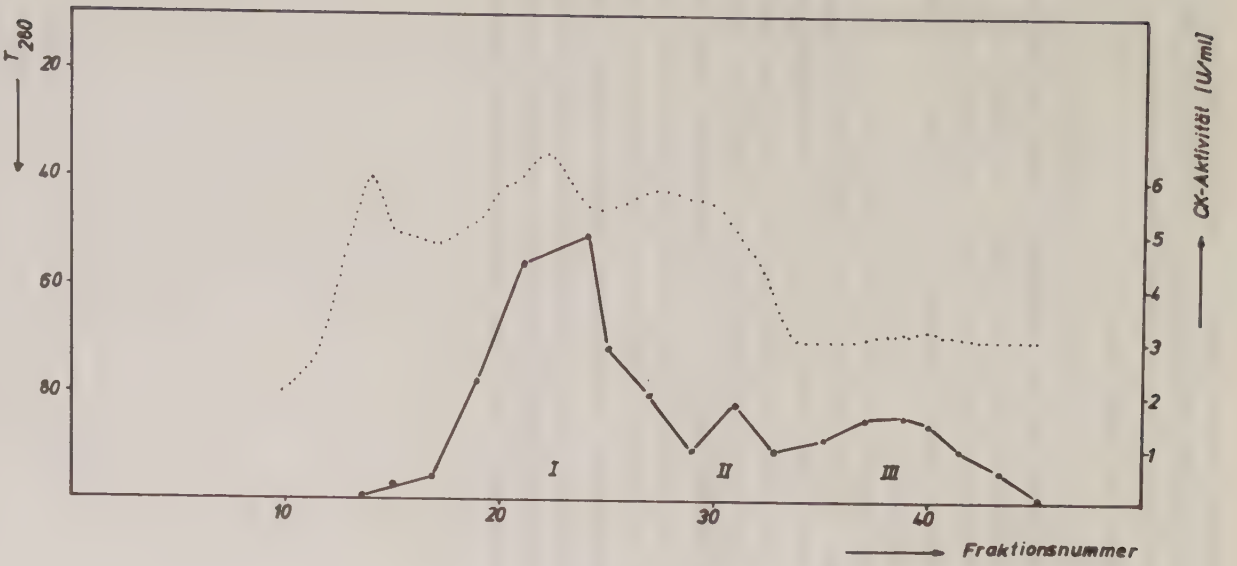


Abb. 7: Gelchromatographie des Rohextraktes aus Humanherz an Sephadex-G-200
(Fr. 25-45%iger AS-Sättigung)
Säule: 180 x 1200 mm
Puffer: 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, 0,001 M EDTA und 0,02 M 2-Mercaptoäthanol
Fraktionsvolumen: 3 ml
I und II: Partikelgebundenes Enzym; III: CK-MM und CK-MB (vgl. Abb. 6)
.....T_{280} ; •——• CK-Aktivität (Hinreaktion)

Rolle des gebundenen Enzyms liegt in der Synthese von Creatinphosphat und ADP (Hinreaktion), während die der löslichen Creatinkinasen in der raschen Bereitstellung von ATP (Rückreaktion) zu sehen ist.

Aus dem Vorangegangenen errechnet sich der Anteil des mitochondrialen Enzyms an der Gesamtaktivität des Herzextraktes zu 23% (Hinreaktion) oder 11,5% (Rückreaktion). Dieser letztere Wert stimmt mit den Daten, die durch quantitative immunologische Untersuchungen erhalten wurden (siehe Teil C), gut überein.
Aus dem Elutionsdiagramm der Gelfiltration (Abb. 7) und aus der Untersuchung des Gipfels I in der SDS-Disk-Elektrophorese (nach LÄMMLI, 1970), der darin die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie CK-MM und CK-BB besitzt, kann man schließen, daß CK_m ein Oligomeres von solchen Untereinheiten darstellt, die das gleiche MG aufweisen wie die Untereinheiten M und B. In dieser Hinsicht besitzen das humane mitochondriale Enzym und das Enzym aus Rinderherz ähnliche Eigenschaften (JACOBS, 1974). Die kathodische, dem Muskeltyp vergleichbare elektrophoretische Wanderung von CK_m läßt die Vermutung zu, daß das Enzym ebenfalls aus M-Untereinheiten besteht. Für eine eindeutige Klärung dieser Frage sind weiterführende Untersuchungen nötig.

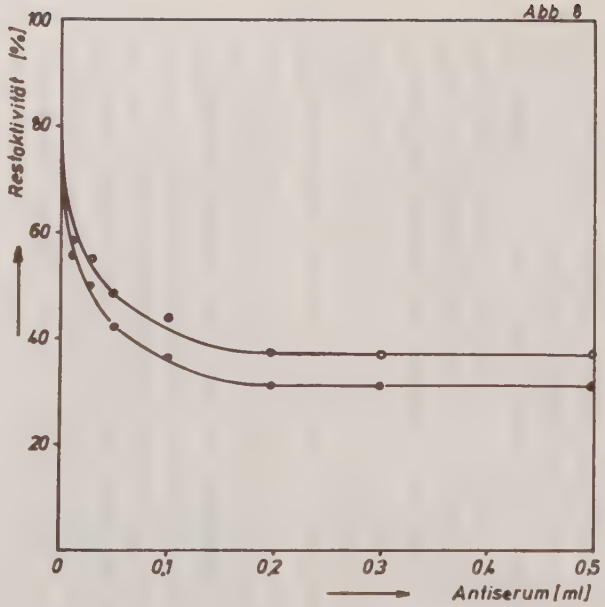
TEIL B : IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

Die unterschiedliche Antigenität der Creatinkinasen CK-MM und CK-BB wurde erstmals von EPPENBERGER et al. (1967) für die Isoenzyme vom Huhn bewiesen. Antikörper gegen das Muskelisoenzym reagierten im Komplementbindungstest mit dem homologen Isoenzym, aber nicht mit dem Gehirntyp, während Antikörper gegen CK-BB entgegengesetzte Spezifität aufwiesen. Das künstlich erzeugte Hybrid CK-MB reagierte mit beiden aus Kaninchen gewonnenen Antiseren unterschiedlich und nur in schwachem Maße. Untersuchungen von BULCKE und SHERWIN (1969) und VIALA et al. (1970) brachten ähnliche Resultate: Antikörper von Huhn und Ratte gegen CK-MM aus Kaninchenmuskel hemmten das homologe Enzym und zeigten keine Kreuzreaktion mit dem Gehirntyp. Nur die Isoenzyme der zwei erwähnten Spezies, Huhn und Kaninchen, waren bisher immunologisch untersucht worden.

Untersuchung der Creatinkinasen vom Schwein

BULCKE und SHERWIN (1969) hatten gezeigt, daß Antikörper gegen CK-MM aus Kaninchenmuskel ebenso gut mit dem Isoenzym aus Humanmuskel, wie mit dem Homologen reagieren. Die Verwendung solcher Antiseren für immunhistochemische Studien am menschlichen dystrophischen Muskel (KARPATI und SHERWIN, 1971) gab den Anstoß zu dem eigenen Versuch, Antiseren gegen die CK-Isoenzyme vom Schwein zu erzeugen und diese für die immunologischen Untersuchungen der humanen Isoenzyme einzusetzen. Überraschenderweise blieb aber die Immunisierung von Puten und Kaninchen mit dem Isoenzym aus Schweinhirn erfolglos. In beiden Spezies konnten keine Antikörper gegen dieses Enzym gewonnen werden. Nach einer persönlichen Mitteilung von Herrn Dr. Würzburg, Darmstadt, stellt CK-BB vom Schwein auch in Ziegen, Schafen und Ratten ein sehr schwaches Immunogen dar. Immunbiologische Untersuchungen, die er an Ratten durchführte, ergaben, daß die Immunantwort auf den Gehirntyp vom Schwein nicht unter genetischer Kontrolle steht. Da Kaninchen ebenso wie Ratten im Gegensatz zu Hunden oder etwa Primaten in ihrem Blut den Gehirntyp der CK enthalten (MELTZER und GUSCHWAN, 1972), ist eine Toleranz dieser Tiere

gegenüber dem strukturell ähnlichen, weil verwandten Protein nicht auszuschließen.
Die Immunisierung von Puten mit dem Muskelisoenzym vom Schwein war ebenfalls negativ; dagegen konnten in Kaninchen Antikörper gegen dieses Isoenzym gewonnen werden. Über deren Reaktion mit CK-MM vom Schwein und CK-MM aus Humanmuskel soll im folgenden berichtet werden.
Als Nachweis der immunologischen Reaktion diente neben der Doppeldiffusion (OUCHTERLONY, 1962) die Hemmung, der die Enzyme bei der Reaktion mit Antikörpern unterliegen. Unter Hemmung wird die prozentuale Abnahme der ursprünglichen Aktivität bei der Inkubation des Enzyms mit steigenden Mengen von Antiserum verstanden. Ihre Differenz gegenüber 100%, die Restaktivität, stellt die Summe aus den Aktivitäten der gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe und der Aktivität des freien Antigens dar. Von ihr zu unterscheiden ist die Aktivität, die nach Abzentrifugation der sedimentierbaren Komplexe im Überstand verbleibt. Sie wird ebenfalls prozentual auf die anfängliche Aktivität des Antigens bezogen.
Abb. 8 zeigt die Hemmung und Präzipitation des Muskelisoenzyms aus Schwein durch das homologe Antiserum. Die Wirkung dieses Antiserums auf die Creatinkinase aus Humanmuskel ist in Abb.9 dargestellt. Folgendes kann festgestellt werden:
1) Das gegen das Isoenzym vom Schwein gerichtete Antiserum vermag dieses nicht quantitativ zu hemmen oder zu präzipitieren. Die Restaktivität erreicht vor und nach Zentrifugation Endwerte, die durch fortgesetzte Zugabe von Antiserum nicht mehr unterschritten werden.
2) Der nach der Zentrifugation erreichte Endwert (32%) unterscheidet sich kaum von dem im kompletten Ansatz gemessenen Wert (36%).
3) Das humane Muskelisoenzym wird durch das Antiserum gegen CK-MM vom Schwein um annähernd den gleichen Betrag gehemmt und präzipitiert wie das Isoenzym vom Schwein selbst.
Der Grund für den unter 1) beschriebenen Sachverhalt ist im wesentlichen darin zu sehen, daß CK-MM vom Schwein ebenso wie das Gehirnisoenzym der gleichen Spezies nur ein schwaches Immunogen darstellt, so daß die in der Abb. 8 gezeigte Hemm-



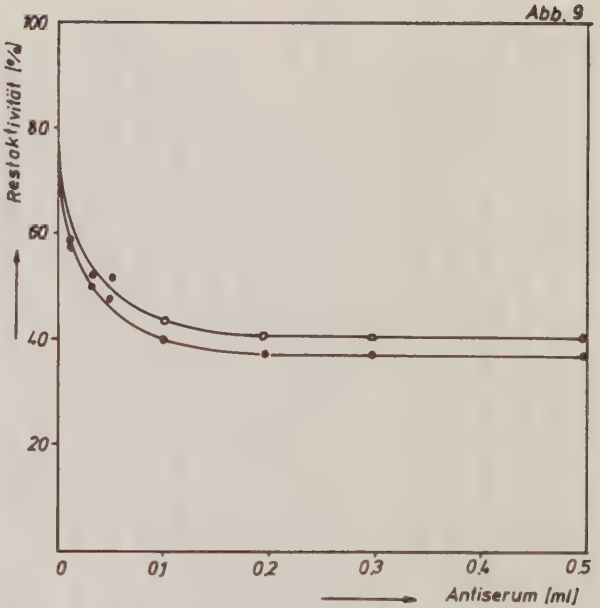


Abb. 8 und 9: Hemmung und Präzipitation von CK-MM vom Schwein (Abb. 8) und von Human-CK-MM (Abb.9) durch Antiserum gegen das Isoenzym vom Schwein.
300 mU CK-MM vom Schwein und 300 mU Human-CK-MM wurden jeweils mit steigenden Antiserummengen inkubiert.
o----o Restaktivität im kompletten Ansatz;
●——● Restaktivität nach Zentrifugation

kurve als die Wirkung wenig affiner Antikörper angesehen werden kann. Betrachtet man das Antiserum als eine heterogene Population von Antikörpern, so scheint es, daß die zur Quervernetzung und Aggregation beitragenden Antikörper den hemmenden Antikörpern bei der Konkurrenz um die Bindungsstellen unterliegen: eine weitere Abnahme der Restaktivität durch Entfernung größerer Enzym-Antikörper-Komplexe bei der Zentrifugation ist nicht festzustellen.
Da das Antiserum gegen CK-MM vom Schwein eine schwache Wirkung auf diese ausübt, ist es nicht weiter überraschend, daß es eine ähnliche Spezifität und Affinität für das humane Isoenzym zeigt, wie aus dem Verlauf der Kurven (Abb. 8 und 9) und der Einstellung nahezu identischer Endwerte ersichtlich ist.
Die Untersuchung beider Systeme in der Doppeldiffusion führt zu den gleichen Ergebnissen (Abb. 10 unten). Zwischen den Präzipitationslinien des homologen (rechts) und des verwandten Systems (links) bildet sich kein Sporn, was das Fehlen von speziesspezifischen Antideterminanten und die schwache Immunogenität vom Isoenzym aus Schweinemuskel verdeutlicht.
Diese Ergebnisse zeigen, daß sich das eingangs erwähnte Ziel, Antikörper gegen Antigene vom Schwein für immunologische Studien der humanen CK-Isoenzyme zu verwenden, nicht erreichen läßt.
CK-MM vom Schwein wird durch das Antiserum gegen humane CK-MM stärker gehemmt (Abb. 11) als durch entsprechende Mengen des homologen Antiserums (Abb. 8). In diesem Fall ist die Präzipitationskurve mit der Hemmkurve identisch,was zu der Annahme führt, daß die mit CK-MM vom Schwein reagierenden Antikörper zwar ausgeprägte Hemmwirkung, aber keinerlei Fähigkeit zur Quervernetzung besitzen. Das Ergebnis der Doppeldiffusion bestätigt diese Annahme: zwischen dem Isoenzym vom Schwein und dem Antiserum gegen humane CK-MM ist keine Präzipitationslinie zu erkennen (Abb. 10 oben). Da das Ausbleiben der Präzipitation nicht durch sterische Behinderung der bindenden Antikörper erklärt werden kann, ist die Ursache für diesen Sachverhalt eher in der selektiven Bindung der hemmenden Antikörper (im Sinne von CINADER, 1967) zu suchen.

Abb. 10: Reaktion von Antiserum gegen CK-MM aus Humanmuskel (1) und CK-MM vom Schwein (2) mit den Isoenzymen CK-MM vom Menschen (3) und CK-MM vom Schwein (4). Ergebnis der Doppeldiffusion nach OUCHTERLONY (1962).

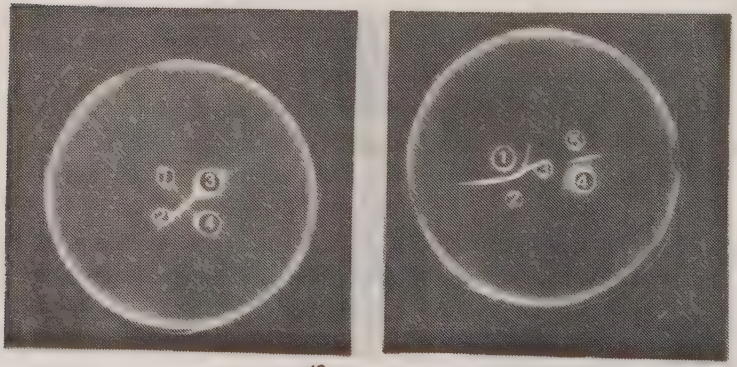
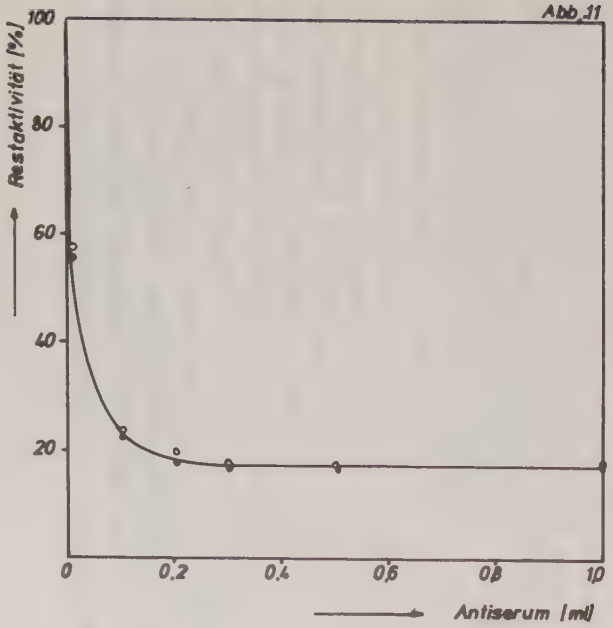


Abb. 13: Doppeldiffusion nach OCHTERLONY. Reaktion von CK-MM (1) und CK-BB (2) aus Humangewebe mit den homologen Antiseren Anti-CK-MM (4) und Anti-CK-BB (3).

Abb. 14: Untersuchung der Reaktion von Anti-CK-MM (1) mit CK-MM (2) und CK-MB (3) und der Reaktion von Anti-CK-BB (4) mit CK-BB (5) und CK-MB (3) aus Humangewebe. Ergebnis der Doppeldiffusion nach OUCHTERLONY (1962).



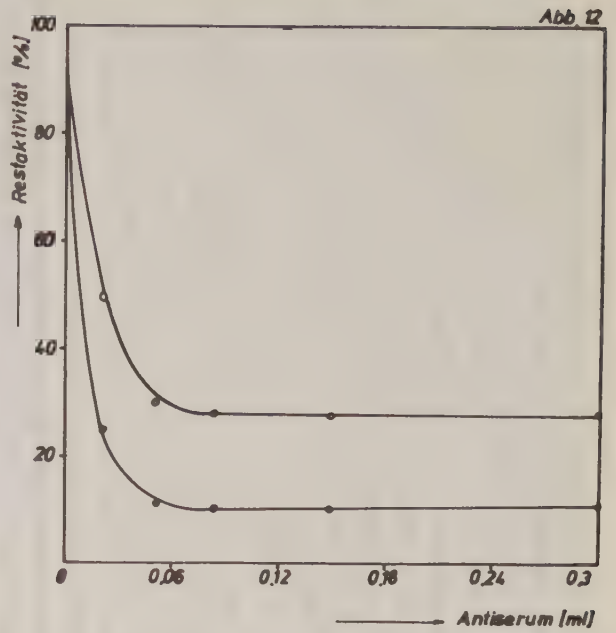


Abb. 11: Hemmung des Muskelisoenzyms vom Schwein durch Antikörper gegen Human-CK-MM. 300 mU CK-MM vom Schwein wurden mit steigenden Antiserummengen inkubiert.

Abb. 12: Hemmung und Präzipitation des Gehirnisoenzyms vom Schwein durch Antiserum gegen Human-CK-BB. 100 mU CK-BB vom Schwein wurden mit steigenden Antiserummengen inkubiert.

o----o Restaktivität im kompletten Ansatz;
●——● Restaktivität nach Zentrifugation

Das Antiserum gegen humane CK-BB vermag den Gehirntyp vom Schwein zu hemmen (70%) und weitgehend zu präzipitieren (Abb. 12). Von immunbiologischer Seite verdient diese Reaktion aus folgendem Grund besonderes Interesse: durch die direkte Immunisierung von Kaninchen mit CK-BB vom Schwein konnten in keiner Weise Antikörper gegen dieses Enzym gewonnen werden; dagegen war es möglich, durch Immunisierung der gleichen Spezies mit Human-CK-BB Antikörper gegen das menschliche Enzym zu gewinnen, die auch mit CK-BB vom Schwein zu reagieren vermögen.

Untersuchung der menschlichen Creatinkinasen

a) Gelpräzipitation

Die in Kaninchen erzeugten Antiseren gegen die humanen CK-Isoenzyme, Anti-CK-MM und Anti-CK-BB, reagieren spezifisch mit den entsprechenden homologen Antigenen; das verdeutlichen die gekreuzten Präzipitationslinien in der Doppeldiffusion (Abb. 13). Die CK-Isoenzyme aus Humangewebe besitzen also unterschiedliche antigene Eigenschaften und veranlassen die Bildung unterschiedlicher Antikörper entsprechend den eingangs zitierten Befunden für die Creatinkinasen vom Kaninchen und vom Huhn.
Die immunologische Reaktion des Hybrids CK-MB mit Anti-CK-MM bzw. mit Anti-CK-BB läßt sich unter zwei Aspekten betrachten: sie kann entweder der Reaktion des untersuchten Antiserums mit dem homologen Isoenzym gegenübergestellt (Reaktion eines Antiserums mit zwei Antigenen) oder mit der Reaktion des heterologen Antiserums verglichen werden (Reaktion eines Antigens mit zwei Antiseren). Den ersten Aspekt bringt die Doppeldiffusion (Abb. 14), den zweiten die zweidimensionale Immunelektrophorese nach LAURELL (1966) zum Ausdruck (Abb. 15 und 16). Der deutliche Sporn zwischen den Präzipitationslinien von CK-MB und CK-MM (Abb. 14, links) deutet auf eine entfernte serologische Verwandtschaft der beiden Antigene bezüglich des untersuchten Antiserums, Anti-CK-MM, die folgendermaßen zu erklären wäre: Der Austausch der M-Untereinheit durch die heterologe B im dimeren Molekül MM bewirkt

drastische Veränderungen der Determinanten der Untereinheit M. Die gegen M-Determinanten gerichteten und mit ihnen gut reagierenden Antikörper besitzen für die im Hybrid veränderten M-Determinanten eine geringere Affinität oder reagieren sogar nicht mehr mit ihnen.
Im heterologen System BB liegen andere Verhältnisse vor. CK-BB und das Hybrid werden von dem hier untersuchten Antiserum als serologisch nahe verwandt erkannt, was sich in dem schlecht ausgebildeten Sporn zwischen den Präzipitationslinien (rechts) verdeutlicht. Es ist demnach anzunehmen, daß sich beim Austausch einer B-gegen eine M-Untereinheit im BB-Molekül die Determinanten nicht verändern, oder, was wahrscheinlicher ist, daß Antikörper, die ohnehin keine sehr starke Affinität für die B-Untereinheit besitzen, Veränderungen an deren Determinanten in geringerem Maße erkennen.

In der zweidimensionalen Immunelektrophorese werden gleiche Mengen von CK-MB durch gleiche Konzentrationen von Anti-CK-MM (Abb. 15) und Anti-CK-BB (Abb. 16) in verschieden großen Flächen präzipitiert, wobei die Präzipitationsfläche in der Anti-CK-MM-Platte die in der Anti-CK-BB um ein Vielfaches übertrifft. Werden also die immunologischen Reaktionen beider Antiseren mit CK-MB miteinander verglichen, so zeigen die Antikörper gegen CK-BB die größere Affinität zum Hybrid.

Proben der CK-Isoenzyme gleicher Proteinkonzentration, aber infolge Alterung verminderter enzymatischer Aktivität, präzipitierten in der einfachen radialen Immundiffusion nach MANCINI et al. (1964) in kleineren Flächen. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, daß die immunologische Reaktionsfähigkeit der Creatinkinasen mit der enzymatischen Aktivität gekoppelt ist und daß beide wiederum von der intakten Konformation der Enzyme abhängen. Eine Veränderung der Konformation, wie z.B. die durch Einfrieren hervorgerufene Dissoziation von Untereinheiten des Gehirntyps der CK, führt zum Verlust der enzymatischen und zugleich der immunologischen Aktivität des Enzyms. Eine wenn auch nicht vollständige Reaktivierung von CK-BB ist jedoch durch Zusatz von 2-Mercaptoäthanol möglich.

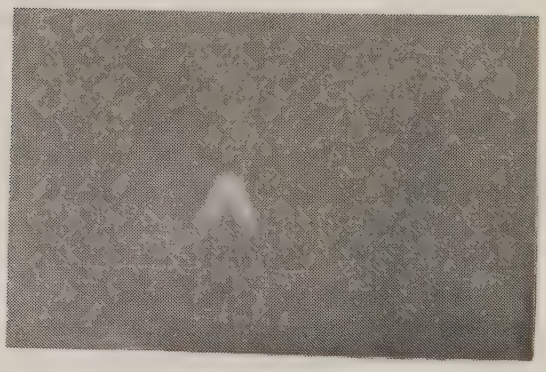


Abb. 15

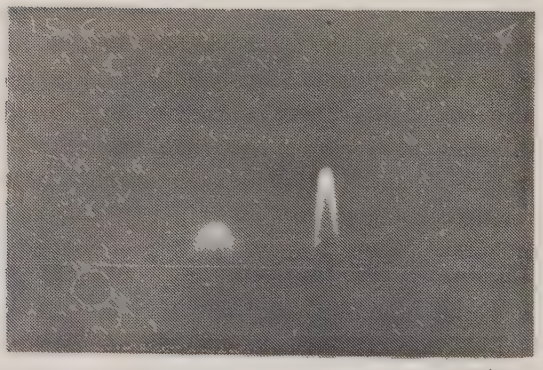


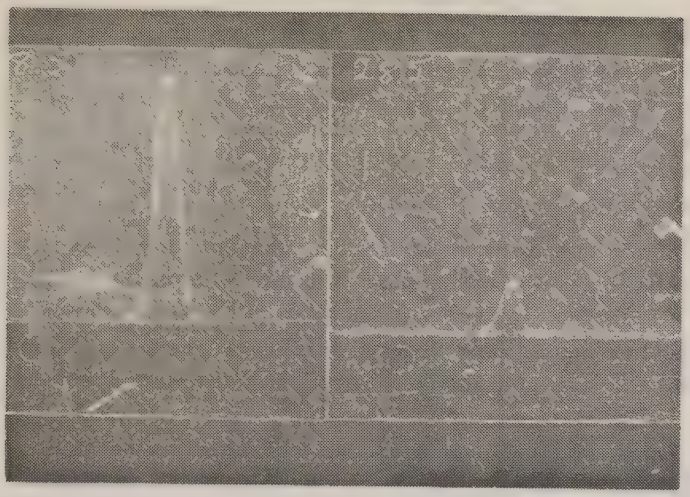
Abb. 16

Abb. 15 und 16: Präzipitation einzelner Isoenzyme der Creatinkinase in der zweidimensionalen Immunelektrophorese nach LAURELL (1966).

Abb. 15: Reaktion von CK-MB mit Anti-CK-MM (10% Antiserum im Gel).

Abb. 16: Reaktion von CK-MB und CK-BB mit Anti-CK-BB (10% Antiserum im Gel).

Eingetragen wurden jeweils 60 mU (Hinreaktion).(Da CK-MM bei einem pH von 8,6 elektrophoretisch nicht wandert, ist ihre Untersuchung in der LAURELL-Elektrophorese unmöglich.)



a) b)

Abb. 17 a) und b): Vergleich zwischen unbehandelter und reaktivierter CK-BB in der zweidimensionalen Immunelektrophorese nach LAURELL (1966)

a) 4 µg CK-BB, unbehandelt
b) 4 µg CK-BB nach Einfrieren, Wiederauftauen und nach Reaktivierung durch 2-Mercaptoäthanol

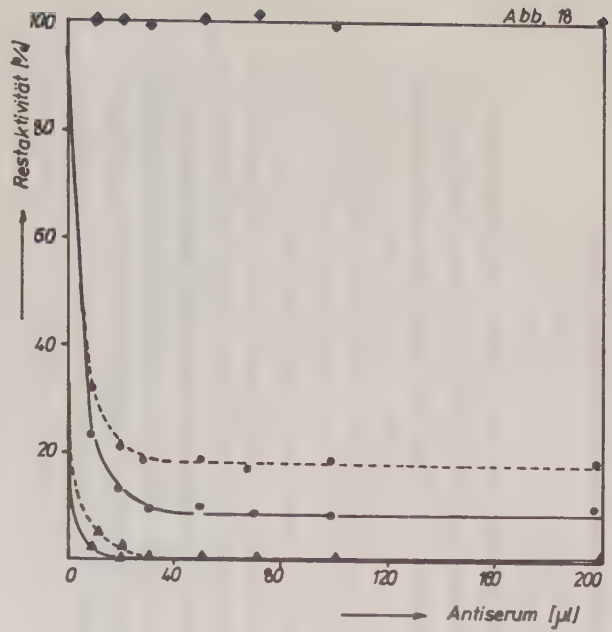
Antikörpergel: 9% an Anti-CK-BB
Die Aktivität der in a) eingetragenen unbehandelten Probe beträgt 300 mU in der Hinreaktion, der in b) 70 mU.

Wie man der Abb. 17 entnehmen kann, werden parallel mit der enzymatischen Aktivität die elektrophoretische Wanderung und die immunologische Reaktionsfähigkeit des Enzyms wiederhergestellt.

b) Hemmtest

Die Untersuchung der Hemmung und Präzipitation der drei multiplen Formen der Creatinkinase bei der Bindung von Anti-CK-MM (Abb. 18) und Anti-CK-BB (Abb. 19) ermöglichen die quantitative Bestimmung ihrer immunologischen Reaktionsfähigkeiten. Aus den Abbildungen läßt sich folgendes entnehmen:
Die reinen Isoenzyme werden durch die heterologen Antikörper im Rahmen der Fehlergrenze weder gehemmt noch präzipitiert; das bedeutet, daß auch unter den Bedingungen des Hemmtestes keine Kreuzreaktion stattfindet (vgl. Abb. 13).

In Übereinstimmung mit den Befunden von SAMUELS (1963) für das Enzym aus Kaninchenmuskel wird der humane Muskeltyp CK-MM durch sein homologes Antiserum quantitativ gehemmt, während die gegen CK-BB gerichteten Antikörper den Gehirntyp nicht vollständig zu hemmen vermögen. Nach SAMUELS kommt die vollständige Hemmung des Muskeltyps dadurch zustande, daß das Enzym bei der Bindung der Antikörper in einer räumlichen Struktur fixiert wird, was die für die Katalyse notwendige Konformationsänderung unmöglich macht. Demgegenüber sind die Determinanten des Gehirntyps wahrscheinlich so lokalisiert, daß die Konformation des "arbeitenden" Enzyms dort trotz der Antikörperbindung noch teilweise eingenommen werden kann.
Beide reinen Isoenzyme werden durch ihre homologen Antiseren quantitativ sedimentiert.
Die Hybridform CK-MB wird bei der Inkubation mit Anti-CK-MM stärker gehemmt (80%), als es der Zusammensetzung des Moleküls nach zu erwarten wäre. Die Vermutung, daß die Besetzung der einen Hälfte des Dimeren mit Antikörpern die Konformation der anderen Hälfte beeinträchtigt, liegt nahe. Entsprechendes ist auch für die Reaktion von CK-MB mit Anti-CK-BB anzumerken.



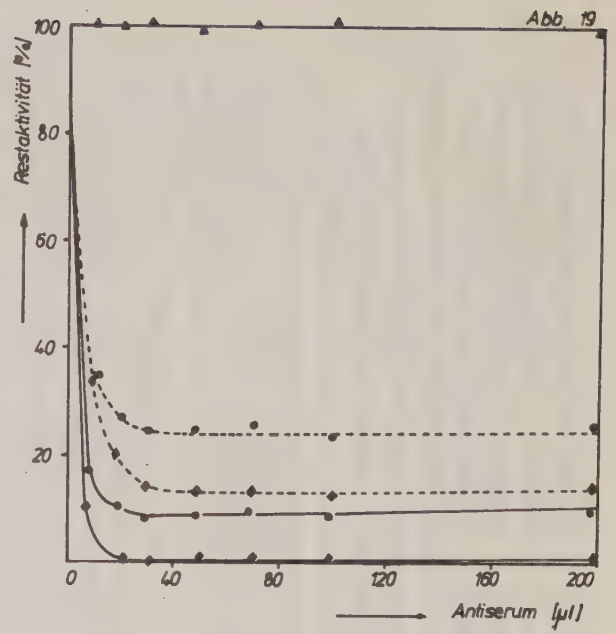


Abb. 18 und 19: Hemmung und Präzipitation der Isoenzyme der CK aus Humangewebe durch Anti-CK-MM (Abb. 18) und Anti-CK-BB (Abb. 19).
100 mU CK-MB und CK-BB sowie 300 mU CK-MM wurden jeweils mit steigenden Antiserummengen inkubiert. Die Restaktivität im kompletten Ansatz wird durch die unterbrochenen Kurven, die nach Zentrifugation durch die durchgezogenen Kurven wiedergegeben.

▲ CK-MM; ● CK-MB; ◆ CK-BB

Das Hybrid läßt sich durch keines der beiden Antiseren vollständig präzipitieren; in jedem Fall stellt sich ein Endwert ein (10% Restaktivität), der durch fortgesetzte Zugabe des jeweiligen Antiserums nicht unterschritten wird. Der Zusatz von Anti-Kaninchen-γ-Globulin hat keinen Einfluß auf diese Restaktivität; sie kann daher nicht auf lösliche Enzym-Antikörper-Komplexe zurückgeführt werden. Andererseits vermag das komplementäre Antiserum die restliche Aktivität sofort zu sedimentieren. Dieser Sachverhalt läßt sich durch die Annahme einer Dissoziation des Hybrids während der Reaktion mit Anti-CK-MM oder Anti-CK-BB erklären: im Überstand verbliebene, in Bezug auf das zugefügte Antiserum heterologe und daher nicht präzipitierbare Monomere sollten sich zu den Dimeren MM bzw. BB zusammenlagern und dann durch Zusatz des komplementären Antiserums sedimentierbar werden. Bei der elektrophoretischen Untersuchung des Überstands eines Inkubationsgemisches von CK-MB und Anti-CK-MM ließ sich die Bildung von CK-BB aus nicht präzipitierten monomeren Untereinheiten tatsächlich erkennen: im Elektropherogramm zeigte sich eine enzymatisch anfärbbare Bande, die in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit derjenigen des Gehirntyps, CK-BB, entsprach, und die vorher nicht zu erkennen war.

c) Immuntitration

Aus den Präzipitationskurven in Abb. 18 und 19 ist ersichtlich, daß sich in einem Gemisch der drei Creatinkinasen der Anteil an CK-BB als Restaktivität im Überstand nach Inkubation mit Anti-CK-MM bestimmen läßt. Entsprechend läßt sich der Gehalt an CK-MM aus der Überstandsaktivität nach Inkubation mit Anti-CK-BB ermitteln. Nach Abzug der Aktivitäten beider Isoenzyme von der Gesamtaktivität vor Zugabe der Antiseren wird der Anteil von CK-MB erhalten. Liegt das Hybrid im Gemisch in höheren Konzentrationen vor, so muß die Tatsache berücksichtigt werden, daß es nicht vollständig sedimentiert und daher im Überstand mitgemessen wird. In diesem Fall sind die Anteile der drei Creatinkinasen aus den Überstandsaktivitäten nach den folgenden drei Gleichungen zu berechnen:

(1) a = % Restaktivität im Überstand nach Inkubation mit Anti-CK-MM
= % CK-BB + 10% der Aktivität von CK-MB.

(2) b = % Restaktivität im Überstand nach Inkubation mit Anti-CK-BB
= % CK-MM + 10% der Aktivität des Hybrids.

(3) % CK-MM + % CK-MB + % CK-BB = 100%.

Damit läßt sich der Hybridanteil aus der Formel % CK-MB = (100-a-b)/0,8 errechnen; die Konzentrationen der reinen Isoenzyme werden mit Hilfe der Gleichungen (1) und (2) ermittelt.
Die Eignung dieses Verfahrens, das im folgenden Immuntitration genannt wird, zur quantitativen Bestimmung der Isoenzyme der Creatinkinase wurde zunächst an künstlichen Gemischen mit bekannter Isoenzymzusammensetzung überprüft. Die Gegenüberstellung der experimentellen und der theoretischen Werte in der Tabelle 5 zeigt, daß die theoretischen Werte im allgemeinen mit guter Reproduzierbarkeit erreicht werden.

Tabelle 5: Quantitative Bestimmung der Isoenzyme der Creatinkinase in künstlichen Gemischen. A: theoretische; B: immunologisch ermittelte Werte in %.

	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
CK-MM	60	62	60	61	40	42	20	21	10	11
CK-MB	20	19	30	24	30	25	20	21	30	34
CK-BB	20	19	10	15	30	33	60	58	60	65

Nach der Sicherung des Verfahrens aufgrund der vorausgegangenen Untersuchungen an Gemischen der reinen oder angereicherten Isoenzyme wurde die Immuntitration auch auf Isoenzymgemische unbekannter Zusammensetzung, wie sie in Organextrakten vorliegen, angewandt. Die prozentuale Verteilung der CK-Isoenzyme, die mit Hilfe der Immuntitration ermittelt wurde,

wurde mit den Ergebnissen verglichen, die sich durch Elektrophorese der gleichen Extrakte auf Celluloseacetatfolien mit anschließender Elution der lokalisierten Aktivitätsbanden und deren spektrophotometrischer Bestimmung im Enzymtest erzielen ließen. Die graphische Darstellung (Abb. 20) bringt die Übereinstimmung der Resultate beider Bestimmungsmethoden zum Ausdruck, wobei vorausgesetzt ist, daß die enzymatischen Aktivitäten in der gleichen Richtung der CK-Reaktion gemessen werden. Bei den in Abb. 20 angeführten Werten handelt es sich ausschließlich um Bestimmungen in Extrakten mit hoher CK-Aktivität; solche mit niedriger Aktivität können elektrophoretisch nicht analysiert werden.
Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit von Bestimmungen, die immunologisch in Gemischen von zwei oder drei Isoenzymen durchgeführt wurden, sind in der Tabelle 6 zusammengefaßt. Für die Isoenzyme CK-MM und CK-BB, die direkt aus den Überstandsaktivitäten nach Inkubation und Zentrifugation bestimmt werden, wurde in den verschiedenen drei Gemischen ein Variationskoeffizient von 3,2 - 4,2% ermittelt. Da der Zahlenwert für CK-MB indirekt aus den Meßwerten der Isoenzyme ermittelt wird, bestimmt deren Genauigkeit einerseits die Variation, andererseits die untere Grenze der quantitativen Bestimmung des Hybrids. Der Variationskoeffizient von CK-MB betrug bei den untersuchten Gemischen 21,4 - 27,8% entsprechend seinem Aktivitätsanteil von 18,3 - 10,4%. Als untere Nachweisgrenze von CK-MB wird ein Anteil von 4% an der Gesamtaktivität angesehen.

Ein weiterer Faktor, der bei der Anwendung der Immuntitration in Organextrakten berücksichtigt werden muß, ist die immunologische Reaktion der mitochondrialen Creatinkinase. Das aus Humanherz isolierte Enzym (s.Teil A) zeigte in seiner hochmolekularen Form keine serologische Reaktion mit Anti-CK-MM oder Anti-CK-BB; sein Aktivitätsanteil kann folglich bei der Immuntitration als Überstandsaktivität nach Inkubation des Extraktes mit einem Gemisch aus beiden Antiseren bestimmt werden.

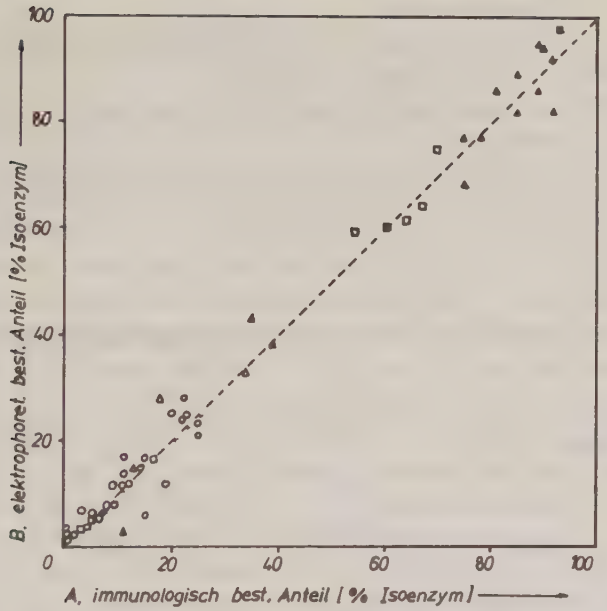


Abb. 20: Beziehung zwischen immunologisch (A) und elektrophoretisch (B) ermittelter Anteile der Isoenzyme der CK (prozentual) in Extrakten aus menschlichen Organen.

△ CK-MM; o CK-MB; □ CK-BB

Tabelle 6: Untersuchungen zur statistischen Variation der immunologischen Bestimmung der Isoenzyme der Creatinkinase.

A. Bestimmung von CK-MM und CK-MB in einem künstlichen Gemisch (n=10)

B. Isoenzymbestimmung in einem Herzinfarktserum (n=10)

C. Isoenzymbestimmung in einem Gemisch von CK-MM, CK-MB und CK-BB (n=5)

	Mittelwert $\bar{x}$ (mU/ml)	Standardabweichung s(mU/ml)	Variationskoeffizient V_k (%)
A. CK-Gesamtaktivität	61,1	1	1,6
CK-MM	49,8	2,1	4,2
CK-MB	11,2	2,4	21,4
B. CK-Gesamtaktivität	404,9	3,8	1
CK-MM	356,6	12,5	3,5
CK-MB	48,5	13,4	27,5
C. CK-Gesamtaktivität	296	3,1	1,1
CK-MM	112	4,3	3,8
CK-MB	30,6	8,5	27,8
CK-BB	154	5,0	3,2

Diskussion

Die drei Formen der Creatinkinase können nach Verfahren analysiert werden, die auf den unterschiedlichen biochemischen, physikalischen und den hier untersuchten immunologischen Eigenschaften der Isoenzyme und des Hybrids beruhen. So haben auf die in Gegenwart hoher und niedriger Substratkonzentrationen verschiedenen Aktivitäten der drei Creatinkinasen bereits EPPENBERGER et al. (1967) hingewiesen. Eine darauf aufbauende Bestimmungsmethode ist aber bisher nur begrenzt und qualitativ angewendet worden (ZALIN, 1972). Die Differenzierung der CK-Isoenzyme nach ihrer unterschiedlichen pH-Abhängigkeit, die nach LEUNIS (1973) ihre Quantifizierung ermöglichen sollte, ist noch nicht näher untersucht worden. Breite Anwendung fand dagegen die elektrophoretische Auftrennung der Isoenzyme auf verschiedenen Trägern wie Agar und Agarose (DEUL und VAN BREEMEN, 1964 ; SHERWIN et al., 1967), Stärkegel (SJÖVALL und VOIGT, 1964), Polyacrylamidgel (SMITH, 1972) und Celluloseacetatfolien (ALLARD und CABROL, 1970). Die CK-Isoenzyme werden nach der Elektrophorese im gekoppelten Test durch Tetrazoliumanfärbung (ROSALKI, 1965; VAN DER WEEN und WILLEBRANDS, 1966), Fluoreszenz (SHERWIN et al., 1967) oder Fluoreszenzlöschung (BURGER et al., 1964) lokalisiert und densitometrisch bestimmt. Diese elektrophoretischen Techniken eignen sich gut für die quantitative Ermittlung der CK-Isoenzyme in Extrakten mit hoher Aktivität, was durch die eigenen Untersuchungen bestätigt wurde. Eine von Blindaktivitäten störungsfreie Bestimmung ist jedoch nur dann gewährleistet, wenn die Isoenzymbanden einzeln eluiert und spektrophotometrisch getestet werden.

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Immuntitration bietet sich als methodisches Hilfsmittel zur Bestimmung der CK-Isoenzyme an, das die immunologische Spezifität mit der Empfindlichkeit der enzymatischen Analyse kombiniert und durch diese Kombination seine Kennzeichnung erfährt.

Der serologische Charakter verleiht der Immuntitration die Spezifität bei der Ermittlung der reinen Isoenzyme, bedingt aber die hohe Variation der indirekten Bestimmung des Hybrids,

gegen das keine spezifischen Antikörper gewonnen werden können. Die enzymatische Analytik gewährt die hohe Empfindlichkeit und recht gute Reproduzierbarkeit der Messungen, bringt aber die eigene, dem komplizierten, zusammengesetzten Testverfahren innewohnende Anfälligkeit mit. Den bisher bekannten Verfahren gegenüber bietet jedoch die Immuntitration den Vorzug einer empfindlichen, von der Aktivität der Probe unabhängigen, schnellen und einfachen Bestimmung der CK-Isoenzyme an, was ihre Anwendung auf jede biologische und klinische Problematik geeignet macht.

TEIL C:

VERTEILUNG DER ISOENZYME DER CREATINKINASE IN MENSCHLICHEN ORGANEN

Verteilung der Isoenzyme der Creatinkinase in adulten Organen

Organe und Gewebe mit unterschiedlicher Funktion sind biochemisch unter anderem dadurch gekennzeichnet, daß sie ein jeweils charakteristisches, von anderen Geweben unterschiedliches Isoenzymverteilungsmuster besitzen. Für die Isoenzyme der Creatinkinase wurde nach den bisherigen Untersuchungen sogar eher strikte Organspezifität als eine organspezifische Verteilung postuliert: man nahm an, daß alle Organe und Gewebe ausschließlich den Gehirntyp CK-BB enthalten, während CK-MM und CK-MB für den Skelett- bzw. Herzmuskel spezifisch sein sollten (DAWSON und FINE, 1967; ALLARD und CABROL, 1970).

Die Untersuchungen, über die hier berichtet wird, lassen eine komplexe Verteilung der CK-Isoenzyme erkennen; sie erlauben die Einteilung der untersuchten Organe in drei Gruppen: in der einen finden sich Organe mit hohem Gehalt an CK-MM (Tab. 7, I); die zweite Gruppe umfasst Organe, die annähernd gleiche Mengen an CK-MM und CK-BB aufweisen (Tab. 7, II), während eine dritte Gruppe Organe mit überwiegendem Anteil von CK-BB enthält (Tab. 7, III).
In den Tabellen sind die Gewebe nach der spezifischen Aktivität der in ihnen enthaltenen Creatinkinase geordnet. Wurden mehrere Proben von einem Organ untersucht, so ist deren Anzahl unter N angegeben. Die Werte für die prozentualen Anteile der Isoenzyme in einzelnen Organextrakten stellen Mittelwerte von Doppelbestimmungen dar. Die Summe der Anteile an löslichen Formen der CK bildet in allen Organen 100%. In Geweben, die das mitochondriale Enzym enthalten, wird diese Summe daher um den CK_m-Gehalt übertroffen.

Von allen untersuchten Organen enthält der humane Skelettmuskel die höchste CK-Konzentration (Tab. 7, I). Die Enzymkonzentrationen in den zwei untersuchten Proben weichen deutlich voneinander ab, was nicht weiter überrascht, da bereits bei Kaninchen (BURGER et al., 1964) wie beim Menschen (KLEINE, 1965 a) unterschiedlich hohe CK-Aktivität in einzelnen Muskelarten nachgewiesen wurden. Wahrscheinlich drückt

Tabelle 7: Verteilung der Isoenzyme der Creatinkinase in adulten Organen (I)

Gewebe	N	CK-Konzentration (U/g Frischgew.)	CK-MM (%)	CK-MB (%)	CK-BB (%)	CK_m (%)
Skelettmuskel	2	860-1310	96-100	0- 3*	0- 1*	2
Zunge	2	225- 292	90- 99	1- 5	0- 5	
Diaphragma	1	140	94	4	2*	5
Herz, adult	6	100- 280	71- 96	4-27	0- 2*	5-15
Mittelwert		157	84	15	1	9
Herz, jugendl. (3-13 Jahre)	4	78- 250	96-100	0- 4	-	
Mittelwert		129	98	2	-	
Arcus Aortae	3	3- 7	81- 88	8-14	3- 5	0- 3
Mittelwert		5,4	84	12	4	2
Schilddrüse	2	13- 34	65- 78	0- 6	16-35	0- 3
Milz	4	0,5- 1,0	69-100	-	0-31	
Mittelwert		0,8	85	-	15	
(Knochen	1	0,1	100	-	-)	

* elektrophoretisch bestimmt

dieser Unterschied einen Zusammenhang zwischen der CK-Aktivität und der Muskelbeanspruchung aus. Die Schwankungsbreite des Hybridgehaltes könnte ebenfalls durch die Unterschiede in den untersuchten Muskelarten bedingt sein; weiße Muskulatur enthält nach ROSALKI (1965) nur CK-MM, rote Muskulatur zusätzlich noch CK-MB. Eine solche Einteilung wurde jedoch hier nicht berücksichtigt. Höhere Anteile an CK-MB und CK-BB als in der Skelettmuskulatur wurden in Zunge und Diaphragma gefunden.

Autolyseprozesse sowie das Einfrieren und Auftauen der Gewebeproben und die Verwendung hypotonischer Extraktionsmedien haben bewirkt, daß die mitochondriale CK nahezu quantitativ von den Partikeln abgelöst wurde. Die höchste Konzentration dieses Enzyms wurde im Herzmuskel gefunden, wo sein Anteil an der Gesamtaktivität 5-15% beträgt. Der Mittelwert (9%) aus 6 verschiedenen Proben stimmt mit dem aus der Isolierung von CK_m ermittelten Wert (11,5%) gut überein (s.Teil A).

Die Schwankungen, denen der Hybridgehalt CK-MB im adulten Herzmuskel unterworfen ist, können mit Sicherheit auf die Labilität dieser Enzymform zurückgeführt werden. Eine Abnahme von CK-MB wurde in Abhängigkeit von der Zeit der Entnahme der Probe sowie von deren Lagerungszeit beobachtet. Die geringen CK-MB-Aktivitäten, die im jugendlichen Herzmuskel gefunden wurden, dürfen nicht gleichermaßen als durch die Instabilität des Materials bedingt angesehen werden, da in allen diesen Fällen Proben von Unfalltoten zur Verfügung standen, die gleich nach der Autopsie zur Untersuchung gelangten. Angesichts dieser unterschiedlich großen Anteile von CK-MB im jugendlichen und adulten Herzmuskel stellt sich die Frage nach einem Zusammenhang zwischen der Belastung des Herzmuskels und seinem Hybridgehalt.
Die herznahe Aorta (Arcus Aortae) enthält im Vergleich zum adulten Herzmuskel eine viel geringere CK-Aktivität; überraschenderweise sind aber die Verteilungsmuster beider Organe sehr ähnlich, obwohl es sich um zwei histologisch unterschiedliche Gewebe handelt (elastische Faser und glatte

Muskulatur gegenüber Herzmuskulatur). Wegen ihrer Tension dienen die herznahen Gefäße als auxiliäre Pumpen, die den kontinuierlichen Fluß des Blutes überhaupt erst ermöglichen; die auffallende Ähnlichkeit der zwei Organmuster läßt sich daher mit ihren verwandten physiologischen Funktionen in Zusammenhang bringen.

Nach DAWSON und FINE (1967) und ALLARD und CABROL (1970) enthält die Schilddrüse ausschließlich CK-BB, während nach GRAIG und SMITH (1967) in diesem Organ drei Formen der CK nachweisbar sein sollten. Bei dem hier ermittelten Organmuster, das neben den drei löslichen noch die mitochondriale Form aufweist, überwiegt eindeutig CK-MM.
Die geringe Aktivität, die in der Milz und in den Knochen gemessen wurde, ist vor allem auf CK-MM zurückzuführen.

Unter den humanen Organen verdient die Lunge besondere Aufmerksamkeit: wie in Tabelle 7, II zu sehen ist, kann im Verteilungsmuster der Creatinkinasen sowohl CK-MM als auch CK-BB überwiegen; gleiche Aktivitäten der beiden Isoenzyme wurden ebenfalls gefunden. Die voneinander abweichenden Muster existieren in verschiedenen Proben ein- und derselben Lunge und sind wahrscheinlich durch die histologisch inhomogene Konstitution des Organs bedingt.

Verglichen mit der herznahen Aorta enthalten die herzfernen Arterien (Carotis und Aorta ascendens) ihrer geringeren Belastung wegen, eine niedrigere CK-Aktivität; der höhere CK-BB-Anteil ist auf die Zunahme der glatten Muskulatur der Tunica Media in der Gefäßwand zurückzuführen.

In der Nebenniere stellt sich das Verteilungsmuster der Creatinkinasen so dar, wie es in einem inhomogenen, aus unterschiedlichen Gewebearten bestehenden Organ zu erwarten ist.
Bei der Bestimmung der CK-Isoenzyme in blutreichen Organextrakten wie z.B. Leber- und Milzextrakten macht sich die Störungsanfälligkeit des komplexen, zusammengesetzten Testsystems bemerkbar. Blindaktivitäten, Metaboliten sowie

Tabelle 7: Verteilung der Isoenzyme der Creatinkinase in adulten Organen (II)

Gewebe	N	CK-Konzentration (U/g Frischgew.)	CK-MM (%)	CK-MB (%)	CK-BB (%)
Lunge	9	2,2	78	-	22
		2,0	73	-	27
		2,0	72	-	28
		5,5	60	-	40
		8,8	56	-	44
		2,1	48	4	48
		4,0	40	-	60
		4,9	28	5	67
		1,9	27	4	69
Rectum	1	3,2	52	-	48
Carotis	1	2,0	56	(2)	42
Aorta ascendens	1	0,9	39	7	54
Nebenniere	2	0,5-0,7	40-60	10	30-50
Leber		0,5	50	-	50)

das Vorliegen endogener 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase erschweren die Messungen. Eine geringe CK-Aktivität wurde in einem einzigen von 9 getesteten Leberextrakten gefunden; sie ist dort ohne Bedeutung.

Großhirn, Kleinhirn, Rückenmark und Hypophyse (Tabelle 7, III) enthalten ausschließlich CK-BB. DAWSON und FINE (1967) fanden die höchste spezifische Aktivität der Creatinkinase in der Rinde von Groß- und Kleinhirn sowie im Nucleus Caudatus, also vorwiegend im Griseum.

Das Verteilungsmuster in den drei Hohlmuskeln Harnblase, Magen und Uterus weist einen überwiegenden Anteil an CK-BB auf, wie es der glatten Muskulatur der Organe auch entspricht. Eine der zwei untersuchten Uterusproben, die von einem älteren Menschen stammte und ein atrophiertes Myometrium zeigte, enthielt zu 93% CK-BB, während die zweite, einem jüngeren Menschen entnommen, höhere Anteile an CK-MM und CK-MB sowie eine höhere CK-Konzentration aufwies.

In Übereinstimmung mit den Befunden von ALLARD und CABROL (1970) wurde im Dünndarm neben CK-BB in geringer Konzentration auch CK-MB gefunden; Colon enthält ausschließlich CK-BB. Die Prostata, die durch ihre glatte Muskulatur gekennzeichnet ist, zeigt dementsprechend eine hohe CK-Konzentration, während der CK-Gehalt vom Pankreas gering ist. Beide Drüsen weisen ein gemischtes Isoenzymmuster auf.

Im Rahmen der experimentellen Untersuchungen war immer wieder festgestellt worden, daß Gewebeproben von Autopsie-Nieren nur eine geringe CK-Aktivität enthielten, die zu 70-100% von CK-MM stammte. Während der Niederschrift dieser Arbeit standen uns zum ersten Mal Proben von Operationsmaterial und frischem Autopsiematerial zur Verfügung; sie enthielten im Gegensatz zu dem vorher untersuchten Autopsiegewebe eine bedeutend höhere CK-Aktivität, die fast ausschließlich auf CK-BB zurückzuführen war. Diese neuesten Befunde lassen vermuten, daß Autolyseprozesse eine drastische Inaktivierung von CK-BB und daher eine Verschiebung des Verteilungsmusters verursachen. Mit ähnlichen Verfälschungen durch

Tabelle 7: Verteilung der Isoenzyme der Creatinkinase in adulten Organen (III)

Gewebe	N	CK-Konzentration (U/g Frischgew.)	CK-MM (%)	CK-MB (%)	CK-BB (%)	CK_m (%)
Großhirn	2	55-90	-	-	100	2-5
Kleinhirn	2	50-87	-	-	100	
Rückenmark	2	23-27	-	-	100	
Hypophyse	1	11	-	-	100	
Harnblase	2	14-35	2- 7	3- 5	89-93	
Magen	2	15-23	3	2- 6	91-95	
Uterus	2	a) 2,9	5	(2)	93	
		b) 9,0	16	20	64	5
Prostata	2	7,2-9,5	34-39	2- 6	59-60	
Dünndarm	2	4,5-6,1	3- 7	6-12	85-87	5
Colon	1	4,8	(2)	-	98	
Niere	4	3,5	-	-	100	
Pankreas	2	0,3-1,2	22-29	0- 5	66-78	
Haut	3	1,5	7	4	89	
Sperma	1	1,0	-	-	100	

Autolyseprozesse muß auch bei den anderen Organen gerechnet werden, in denen nur geringe CK-Aktivität gefunden wurde (z.B. Milz, Nebenniere).

Die geringe CK-Aktivität, die in Hautproben von verschiedenen Stellen der Körperoberfläche gemessen wurde, ist vor allem auf CK-BB zurückzuführen. Das Isoenzymverteilungsmuster war in den drei Proben nahezu identisch, was sicherlich mit der fachmännischen Präparation der Excisate zusammenhängt.
Sperma enthält ausschließlich CK-BB.

Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse werden von verschiedenen Faktoren beeinflußt, wie sie im allgemeinen bei Untersuchungen von Autopsiegeweben auftreten. Hierzu gehören u.a. die Zeitdauer zwischen Todeseintritt und Gewinnung und Aufbewahrung des Materials und die damit zusammenhängenden Autolyseprozesse, die insbesondere Gewebe mit instabilen CK-Isoenzymen betreffen. Das erhaltene Isoenzymmuster wird zudem vom physiologischen Zustand des betreffenden Organs und von dem Alter des Individuums, dem es entstammt, entscheidend geprägt; dies gilt vor allem für die Verteilungsmuster der Organe Herz und Uterus. Die Organverteilung der Creatinkinasen variiert außerdem mit der Topographie innerhalb der untersuchten Gewebe oder Organe (typische Beispiele: Skelettmuskel und Lunge). Schließlich sind die Unterschiede zwischen verschiedenen Individuen zu erwähnen, die sich in der Schwankungsbreite der Ergebnisse ausdrücken. Für die Aufstellung statistisch signifikanter sog. "Normalmuster" der Verteilung der Creatinkinasen in Organen wäre, wie aus der Aufzählung der zu berücksichtigenden Faktoren ersichtlich, eine umfangreiche Untersuchung nötig, die weit über den Rahmen der vorliegenden Arbeit hinausgeht.

In den Herzmuskelextrakten, die neben den reinen Isoenzymen auch die hybride und die mitochondriale Form der CK in größeren Mengen enthalten, wird die Genauigkeit bei der Bestimmung der letzteren durch deren indirekte Ermittlung beeinträchtigt; dies wird jedoch durch die Tatsache, daß hier zum ersten Mal überhaupt die Konzentration des mitochondrialen Enzyms im adulten Humanherz quantitativ bestimmt wurde,mehr als ausgeglichen.

Werden die vorliegenden Ergebnisse mit den Angaben der Literatur verglichen, so stimmen die ermittelten CK-Konzentrationen in Geweben mit den in der Literatur angegebenen größenordnungsmäßig überein (KLEINE, 1965 a; SMITH, 1972). Weiter ist die Korrelation von Skelett- und Herzmuskel mit CK-MM und von glatter Muskulatur mit CK-BB bestätigt worden. Dagegen treten

bei der Gegenüberstellung der einzelnen immunologisch bestimmten - quantitativen - Verteilungsmuster mit den bisher bekannten, elektrophoretisch ermittelten - semiquantitativen - bedeutende Abweichungen auf.

Der Unterschied in der Konzentration und in dem Verteilungsmuster der CK, der in zwei untersuchten Uterusproben festgestellt wurde, ist vermutlich auf das unterschiedliche Alter der Menschen, denen sie entstammten, zurückzuführen; eine bedeutende Abnahme der Konzentration im senilen atrophierten Corpus wurde bereits von KLEINE (1965b) nachgewiesen. Auffallende Verschiebungen im Organmuster sind aber vor allem im graviden Uterus zu erwarten, in dessen Corpus die glatte Muskulatur durch Hyperplasie und Hypertrophie bis zu 15% gegenüber dem Ausgangszustand zunimmt (JAISLE, 1964). Die Konzentration der CK nimmt in den ersten Monaten der Gravidität um das 10fache zu (HASCHEN, 1970). Andererseits ähnelt der gravide Uterus nach RICHTERICH et al. (1963) in Funktion und LDH-Isoenzymmuster mehr dem Skelettmuskel als der normalen visceralen Muskulatur. Parallel dazu kann während der Gravidität auch eine Verschiebung des Isoenzymmusters der CK zum Muskeltyp hin angenommen werden.

Mit Hilfe der Immuntitration war es hier zum ersten Mal möglich, die Identität von Isoenzymen aus verschiedenen Geweben (CK-BB im Magen und Gehirn z.B.) nachzuweisen, die bisher bezweifelt wurde (FOCANT und WATTS, 1973). Darüberhinaus gestattete die Methode einen tieferen Einblick in die Natur der Creatinkinasen in menschlichen Organen: von den untersuchten Organen zeigen Zentralnervensystem und Hypophyse, ferner Colon, Niere und Sperma, ausschließlich CK-BB. Alle anderen Organe enthalten zwei oder drei Formen der CK, diese aber teilweise nur in geringen Konzentrationen.

CK-MM, die in hohen Konzentrationen in der quergestreiften und kardialen Muskulatur vorkommt, erscheint in geringer Konzentration in der Schilddrüse und in sehr kleinen Mengen in allen anderen Organen. Der Herztyp, CK-MB, läßt sich eben-

falls in mehreren Organen nachweisen, während CK-BB in allen untersuchten Organen enthalten ist.

Das gleichzeitige Vorkommen von CK-MM und CK-BB innerhalb einer Zellart äußert sich darin, daß neben diesen Formen zusätzlich die Hybridform auftritt; werden dagegen in einem Organ nur die reinen Isoenzyme und ausschließlich diese gefunden, so ist das auf die Existenz verschiedener Zellpopulationen in der betreffenden Probe zurückzuführen. Mit immunhistochemischen Techniken müßte sich bei weiterführenden Untersuchungen eine einwandfreie Zuordnung von Isoenzymmustern zu bestimmten Zellarten ermöglichen lassen.

Verteilung der Isoenzyme der Creatinkinase in foetalen Organen während der Ontogenese

Da die meisten Organe und Gewebe ein für sie charakteristisches Verteilungsmuster der Creatinkinasen aufweisen, ist anzunehmen, daß diese sogenannten Adultmuster im frühen Embryonalstadium noch nicht ausgeprägt sind. Nach EPPENBERGER et al. (1964) stellt im Huhn der Gehirntyp der CK einen embryonalen Archetyp dar: im Ei findet sich ausschließlich CK-BB. Das Isoenzymmuster des foetalen Gehirns behält während der gesamten Entwicklung den Embryonaltyp CK-BB bei und unterscheidet sich nicht vom adulten; dagegen findet im Verteilungsmuster des Skelettmuskels während der Ontogenese ein Übergang vom Embryonalmuster zum Adultmuster statt: CK-BB und das zwischendurch auftretende Hybrid CK-MB weichen mit fortschreitender Differenzierung dem Muskeltyp CK-MM. Diese Änderung des Isoenzymmusters der CK während der Myogenese wurde auch von anderen Autoren sowohl in vivo (ZITER, 1974; PROCHAZKA und WACHSMUTH, 1972), als auch in vitro (MORRIS et al., 1972; ZALIN, 1973) bei verschiedenen Spezies beobachtet. Für eine ähnliche Entwicklung bei der Differenzierung des menschlichen Muskels sprechen die Befunde von SHAPIRA et al. (1968), GOTO et al. (1969) und die spezielleren quantitativen Untersuchungen von TZVETANOVA (1971). Auch im menschlichen Gehirn wurde während der Foetalperiode ausschließlich CK-BB gefunden (KUMUDAVALLI und WATTS, 1968; CAO et al., 1968). Bisher sind nur der Skelett- und Herzmuskel sowie das Gehirn menschlicher Foeten untersucht worden.
Im folgenden wird über die Verteilung der Creatinkinasen in einzelnen Organen, die menschlichen Foeten verschiedenen Alters entnommen wurden, berichtet. Das Alter der Foeten wurde nach dem in Tab. 8 skizzierten Zusammenhang zwischen Alter in Wochen und Scheitel-Steiß-Länge (SSL) bestimmt. Es wurden Organe und Gewebe von 12 verschiedenen Foeten im Alter von 8 - 30 Wochen (35-290 mm SSL) untersucht.

Tab. 8: Untersuchte menschliche Foeten

Foetus	Scheitel-Steiß-Länge (mm)	Alter in Wochen nach PATTEN(1968)	
1	35	8- 9	Ursache des Schwangerschaftsabbruchs unbekannt
2	40	9	Interruptio
3	85	12-13	Interruptio
4	100	13-14	Vorzeitiger Blasensprung
5*	110	14-15	Interruptio
6	115	15	Ursache des Schwangerschaftsabbruchs unbekannt
7	135	16	Interruptio
8**	145	17	Ursache des Schwangerschaftsabbruchs unbekannt
9**	145	17	Ursache des Schwangerschaftsabbruchs unbekannt
10	170	19	Fehlgeburt
11	220	23-24	Totgeburt?
12***	290	30	Tod durch Gehirnblutung

* Muskel, Lunge und Niere dieses Foeten zeigten eine anomale Verteilung der CK-Isoenzyme.

** Zwillinge; die CK-Aktivität der Organe und die Verteilung der Isoenzyme waren weitgehend identisch.

*** Die angegebene SSL dieses Foeten wurde aufgrund des uns mitgeteilten Alters in Wochen der Literatur entnommen (PATTEN, 1968).

Skelettmuskel

Wie die Abb. 21 zeigt, nimmt die Konzentration der Creatinkinase (U/g Frischgewicht) im Skelettmuskel von Foeten linear mit deren Größe zu. Die prozentuale Verteilung der einzelnen Formen des Enzyms im Skelettmuskel von Foeten unterschiedlichen Alters ist in Abb. 22 dargestellt; zum Vergleich ist dort auch das Adultmuster angegeben. Die Zahlen oberhalb der Prozentflächen geben die Konzentration der CK in den jeweiligen Proben an. Der Skelettmuskel des 40 mm großen Foeten weist die hier als Foetalmuster bezeichnete Isoenzymverteilung auf, bei der die drei Formen der CK in nahezu gleichen Anteilen vorkommen. Demgegenüber zeichnet sich das Adultmuster durch den fast ausschließlichen Gehalt an CK-MM aus. Die Ursache dafür, daß im Muskel des 35 mm großen Foeten bereits eine dem Adultmuster ähnlichere Verteilung, als bei älteren Foeten gefunden wurde, ist wahrscheinlich darin zu suchen, daß in diesem Fall der ganze Arm zur Untersuchung gelangte, während die den älteren Foeten entnommenen Proben der Beinmuskulatur entstammten. In der Foetalperiode(von 85 bis 290 mm SSL) nimmt die Konzentration von CK-BB und CK-MB kontinuierlich ab, die von CK-MM entsprechend zu, wobei das Foetalmuster langsam in das Adultmuster übergeht. TZVETANOVA (1971) konnte nachweisen, daß im Muskel von menschlichen Embryonen (10-15mm) nur CK-BB vorhanden ist. Die von TZVETANOVA für ältere Foeten erhaltenen Resultate unterscheiden sich von den vorliegenden insofern, als der foetale Muskel dort bis zum Ende der Foetalperiode den relativ hohen Anteil von 25-45% CK-MB beibehält.

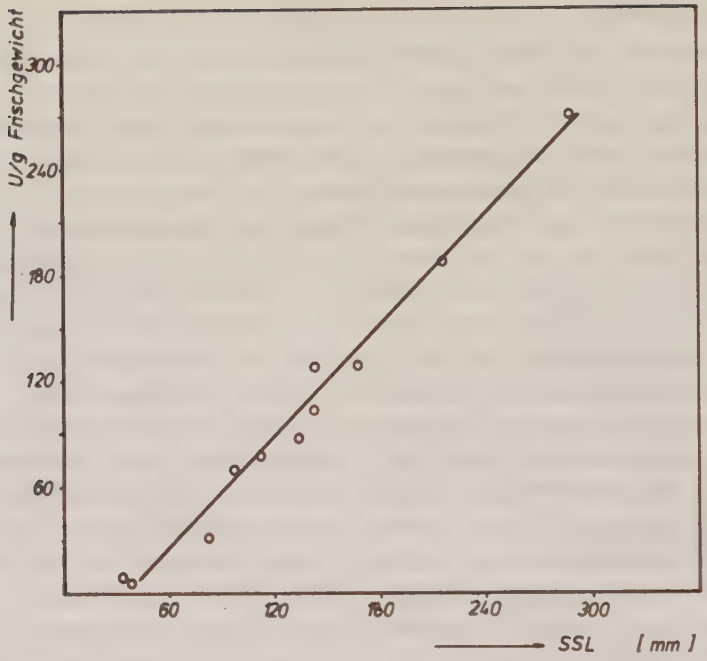


Abb. 21: Konzentration der Creatinkinase (U/g Frischgewicht) im Skelettmuskel menschlicher Foeten in Abhängigkeit von deren Scheitel-Steiß-Länge (in mm).

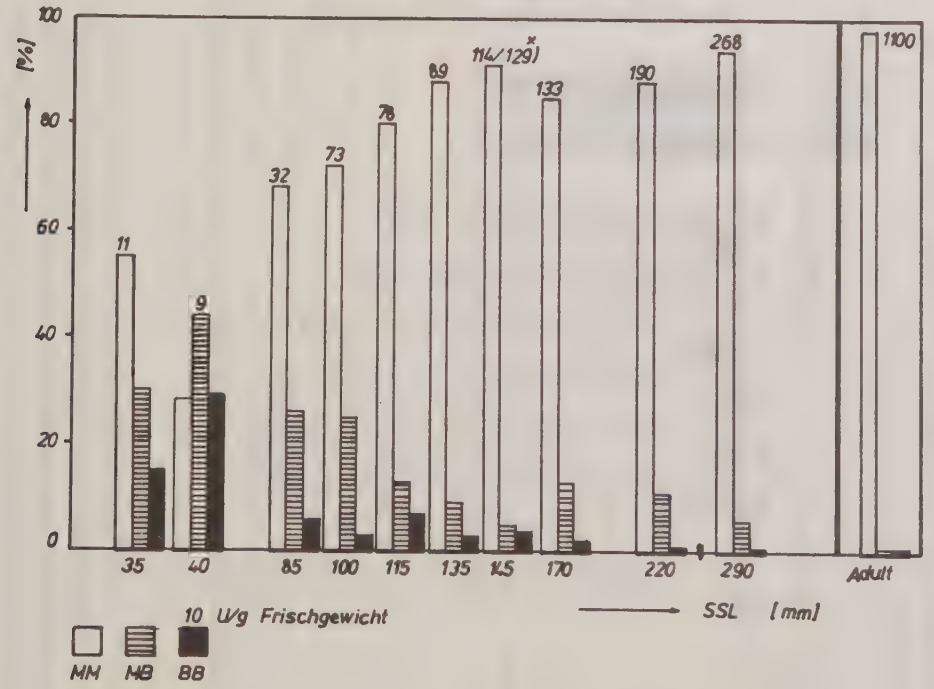


Abb. 22: Verteilung der Isoenzyme der Creatinkinase im Skelettmuskel menschlicher Foeten während der Ontogenese

* Zwillinge

Zunge

Am Beispiel des Verteilungsmusters von Isoenzymen der CK in der Zunge von Foeten wird die Ähnlichkeit der quergestreiften Muskulatur der Zunge mit der des Skelettmuskels auch im analogen Verlauf des Isoenzymmusters deutlich (Abb. 23). Am Anfang der Foetalperiode weist die Zunge ebenfalls das Foetalmuster auf; der Übergang zum Adultmuster verläuft kontinuierlich wie beim Skelettmuskel.

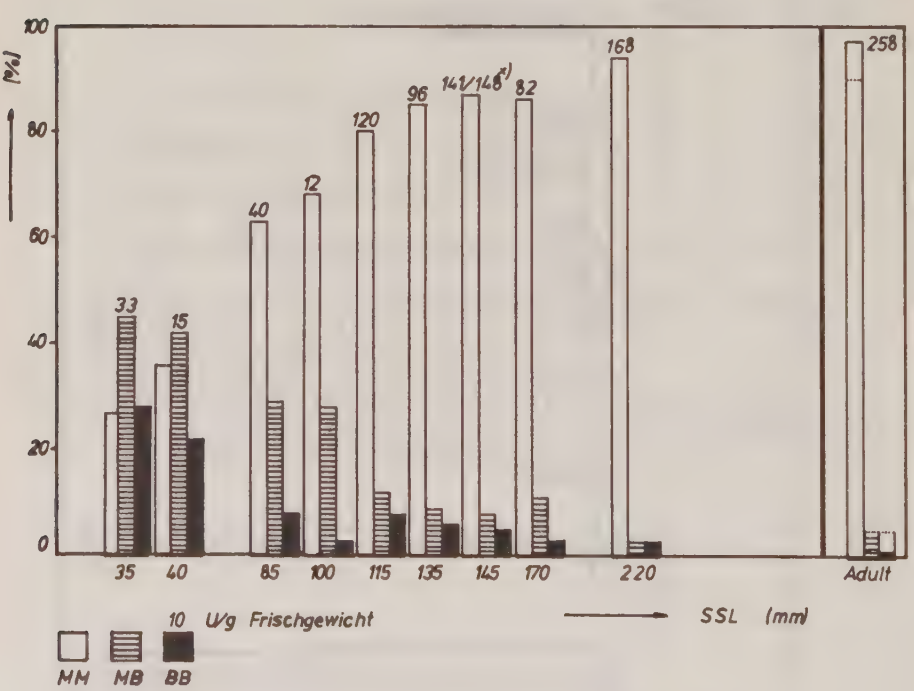


Abb. 23: Verteilung der Isoenzyme der Creatinkinase in der Zunge menschlicher Foeten während der Ontogenese.

* Zwillinge

Diaphragma

Wegen der technischen Schwierigkeit bei der Gewinnung von Diaphragmaproben wurden nur solche von größeren Foeten (110-145 mm) untersucht; ihr Verteilungsmuster ähnelt bereits stark dem Adultmuster und entspricht im übrigen der Verteilung, die im Skelettmuskel und in der Zunge der gleichen Foeten gefunden wurde (Tab. 9). Daher ist auch bei diesem Vertreter der quergestreiften Muskulatur eine ähnliche Entwicklung des Verteilungsmusters anzunehmen, wie sie für Skelettmuskel und Zunge festgestellt wurde.
Diaphragma, Zunge und Skelettmuskel unterscheiden sich aber deutlich hinsichtlich des Verhältnisses zwischen der CK-Konzentration im foetalen und adulten Organ. Die CK-Konzentration im Diaphragma eines 145 mm großen Foeten ist nahezu ebenso hoch wie im adulten Organ, während die Zunge des gleichen Foeten nur 50% der Aktivität der adulten Zunge und der Skelettmuskel weniger als 10% der Aktivität des erwachsenen Muskels enthält.

Tab. 9: Prozentuale Verteilung der Isoenzyme der Creatinkinase im Diaphragma menschlicher Foeten während der Ontogenese.

Foetus	SSL (mm)	CK-Konzentration (U/g Frischgewicht)	CK-MM (%)	CK-MB (%)	CK-BB (%)
5	110	70	83	12	5
6	115	82	87	9	4
7	135	59	93	(1)	6
8	145	139	93	3	4
9	145	109	88	8	4
adultes Diaphragma		140	96	4	2

Herzmuskel

Wie der Abb. 24 entnommen werden kann, weist der Herzmuskel der kleinsten untersuchten Foeten (35 und 40 mm) bereits das Adultmuster auf und unterscheidet sich dadurch von der quergestreiften Muskulatur der Foeten. Der Übergang vom Foetalmuster zum Adultmuster muß hier demnach im frühen Embryonalstadium stattgefunden haben. Der Anteil des Hybrids nimmt während der foetalen Entwicklung fortlaufend ab und nähert sich dem Wert, der im jugendlichen Herz gefunden wurde. Parallel dazu nimmt die Gesamtkonzentration der CK im foetalen Herzmuskel zu und erreicht die CK-Aktivität des jugendlichen Organs. Nach KUMUDAVALLI und WATTS (1968) tritt CK-MM erst in der 13. Woche auf; dies spricht für eine spätere Differenzierung des Herzmusters und steht im Gegensatz zu den vorliegenden Untersuchungen.

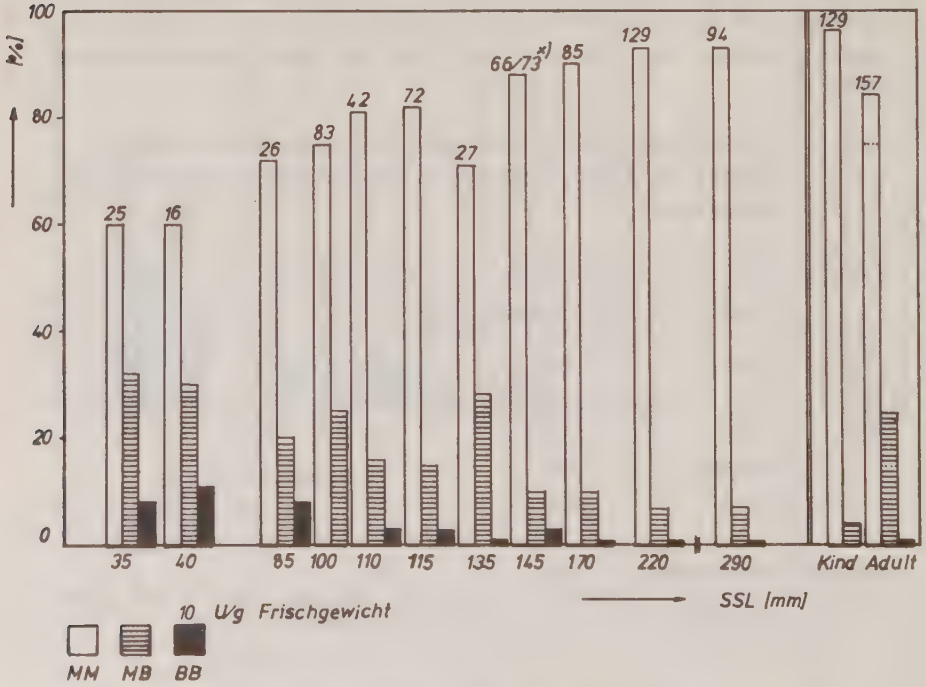


Abb. 24: Prozentuale Verteilung der Isoenzyme der Creatinkinase im Herzmuskel menschlicher Foeten während der Ontogenese.

* Zwillinge

Haut

Überraschenderweise unterscheiden sich Hautproben von Foeten, die verschiedenen Stellen der Körperoberfläche entstammen, sowohl hinsichtlich ihrer CK-Konzentration als auch hinsichtlich des gezeigten Verteilungsmusters. Die Kopfhaut enthält geringe CK-Aktivität; ihr Isoenzymmuster, das überwiegend CK-BB aufweist, verändert sich während der ontogenetischen Entwicklung nicht (Tab. 10a). Dagegen werden in der Haut vom Bein oder vom Bauch nicht nur hohe CK-Konzentrationen sondern auch Isoenzymmuster gefunden, die eine ähnliche Verteilung und Entwicklung zeigen, wie sie in der Skelettmuskulatur beobachtet werden (Tab. 10b). Mann darf annehmen, daß die Unterschiede zwischen den Hautproben auf der jeweiligen histologischen Konstitution beruhen und nicht durch die Präparation der Proben verursacht wurden.

Tab. 10: Prozentuale Verteilung der Isoenzyme der Creatinkinase
a) in der Kopfhaut und
b) in der Haut vom Bauch oder Bein menschlicher Foeten

a)

Foetus	SSL (mm)	CK-Konzentration (U/g Frischgewicht)	CK-MM (%)	CK-MB (%)	CK-BB (%)
3	85	3,0	21	3	76
5	110	3,2	28	5	67
10	170	2,5	25	-	75
11	220	2,8	24	-	76
b) Bauchhaut					
2	40	8,1	50	39	11
3	85	21,6	76	17	7
7	135	9,2	82	8	10
8	145	54,2	80	15	5
9	145	54,6	91	4	5
11	220	18,2	82	3	15
Beinhaut					
11	220	13,9	82	3	15

Gehirn

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von KUMUDAVALLI und WATTS (1968) und CAO et al. (1968) wurde im Gehirn menschlicher Foeten ausschließlich CK-BB gefunden (Tab. 11). Sowohl die Konzentration der CK als auch ihre spezifische Aktivität sind bedeutend geringer als im adulten Gehirn.

Tabelle 11: Prozentuale Verteilung der Isoenzyme der Creatinkinase im Gehirn menschlicher Foeten während der Ontogenese

Foetus	SSL (mm)	CK-Konzentration (U/g Frischgew.)	Spez.Aktivität (U/mg Protein)	CK-MM (%)	CK-MB (%)	CK-BB (%)
2	40	36,2	1,48	-	-	97
3	85	26,4	2,8	-	-	98
4	100	52,2	4,3	-	-	100
5	110	28,2	3,6	-	-	100
6	115	41,2	2,0	-	-	100
7	135	26,2	1,48	-	-	100
8	145	30,7	1,4	-	-	100
9	145	36,7	1,5	-	-	100
10	170	27,5	1,7	-	-	100
11	220	14,3	1,0	-	-	100
adult		55-90	6-7	-	-	100

Magen und Darm

Das Verteilungsmuster im foetalen Magen und Darm (Abb. 26) unterscheidet sich während der untersuchten Entwicklungsperiode nicht von dem Muster der adulten Organe. Im Magen von Foeten verschiedenen Alters wird außerdem im Durchschnitt die gleiche Konzentration an CK wie im erwachsenen Organ gefunden. Dagegen unterliegt die Konzentration der CK in den verschiedenen Darmproben erheblichen Schwankungen; sie übertrifft diejenige,

die im adulten Dünn- und Dickdarm zwar gemessen wurde, die aber - was zu beachten ist - wegen der bereits mehrfach erwähnten Veränderungen durch Autolyseprozesse unter "in vivo" Bedingungen größer sein dürfte.

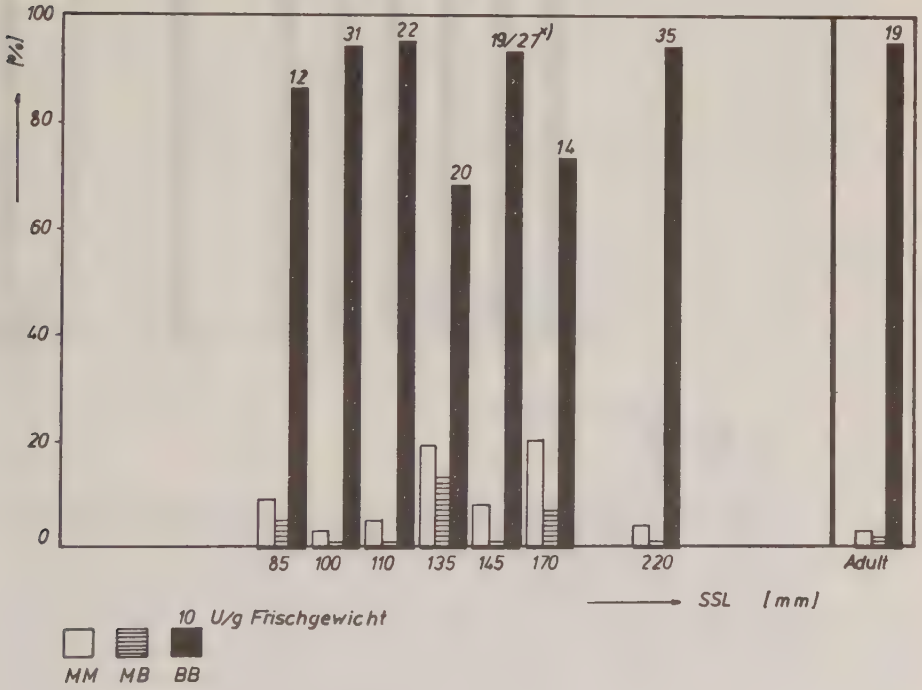


Abb. 25: Prozentuale Verteilung der Isoenzyme der Creatinkinase im Magen menschlicher Foeten während der Ontogenese

* Zwillinge

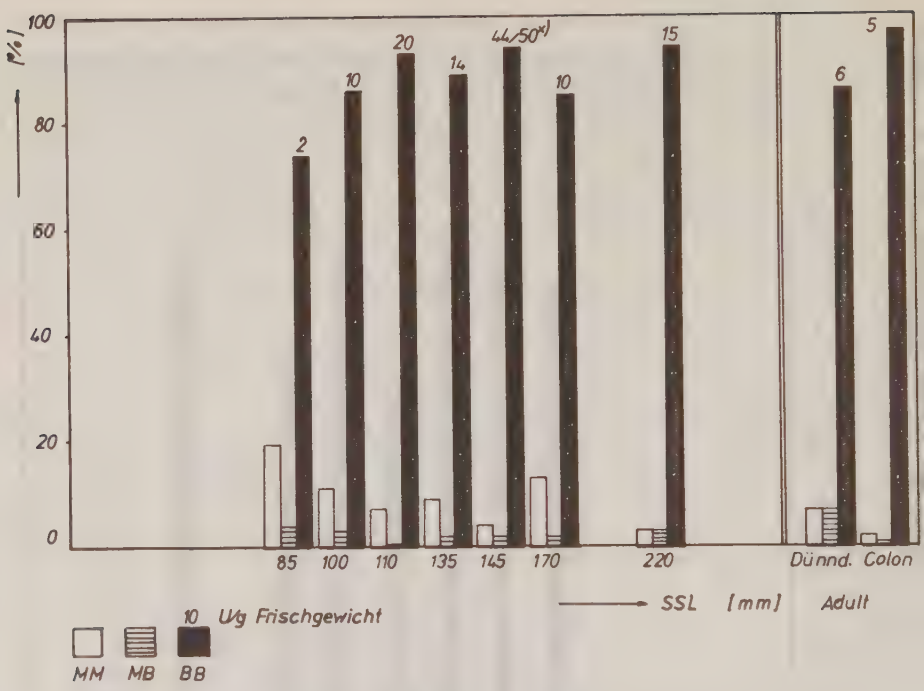


Abb. 26: Prozentuale Verteilung der Isoenzyme der Creatinkinase im Darm menschlicher Foeten während der Ontogenese.

* Zwillinge

Thymus

In kleinen Foeten war die Gewinnung von Thymusproben ähnlich schwierig wie die Isolierung des Diaphragmas, so daß nur Proben von größeren Foeten (115-220 mm) zur Untersuchung gelangten. In diesen überwiegt CK-MM, und das Verteilungsmuster unterliegt während der zweiten Hälfte der Foetalentwicklung keiner Änderung mehr (Tab. 12). Dieses Ergebnis stimmt mit der Histogenese des Organs überein: am Ende des dritten Monats entstehen schnell proliferierende Lymphoblasten aus interstitiellem Gewebe, das wahrscheinlich mesodermalen Ursprungs ist; die resultierende Akkumulation von

Lymphocyten verleiht dem Organ den histologisch lymphoiden Charakter, der bis zur Pubertät unverändert bleibt (PATTEN, 1968).

Tabelle 12: Verteilung der Isoenzyme der CK (in %) im Thymus menschlicher Foeten während der Ontogenese.

Foetus	SSL mm	CK-Konzentration (U/g Frischgew.)	CK-MM (%)	CK-MB (%)	CK-BB (%)
6	115	7,5	83	7	10
8	145	7,3	88	5	7
9	145	2,3	74	16	10
10	170	4,6	77	12	11
11	220	4,0	85	3	12

Lunge

Organe, die aus unterschiedlichen Geweben und Zellpopulationen bestehen und außerdem uneinheitlich differenzieren, zeigen während der Ontogenese ein komplexes Bild der Isoenzymausrüstung; zu diesen Organen gehören Lunge, Nebenniere und Niere. In der Lunge werden zu Beginn der Foetalperiode gleiche Aktivitäten der Isoenzyme und des Hybrids gefunden, während in der weiteren Entwicklung CK-BB überwiegt (Abb. 27). Das Verteilungsmuster im noch wenig differenzierten Organ spiegelt den histologisch drüsenähnlichen Charakter der primitiven Lunge wider (LOOSLI und POTTER, 1959), der sich auch in den von Mesenchym umgebenen Bronchien ausdrückt. In der weiteren canalikulären Histogenese entwickeln sich der endodermale Bronchialbaum mit seiner Epithelialauskleidung und das Gefäßsystem der Lunge. Diesem zweiten Abschnitt der Differenzierung, der mit dem Ende des 6. Monats abschließt, dürfte das Verteilungsmuster der CK entsprechen, das überwiegend CK-BB enthält. Die Klärung der Frage, ob bei

der folgenden Entwicklung der Alveolen eine Veränderung des Isoenzymmusters stattfindet, wie es durch das Muster in der Lunge des 290 mm großen Foeten angedeutet wird, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Ein Vergleich zwischen den foetalen und den Adultmustern der Lunge ist nicht möglich, da die foetalen Organe als ein Ganzes untersucht wurden, während von den adulten Organen topologisch unterschiedliche Proben zur Verwendung gelangten.

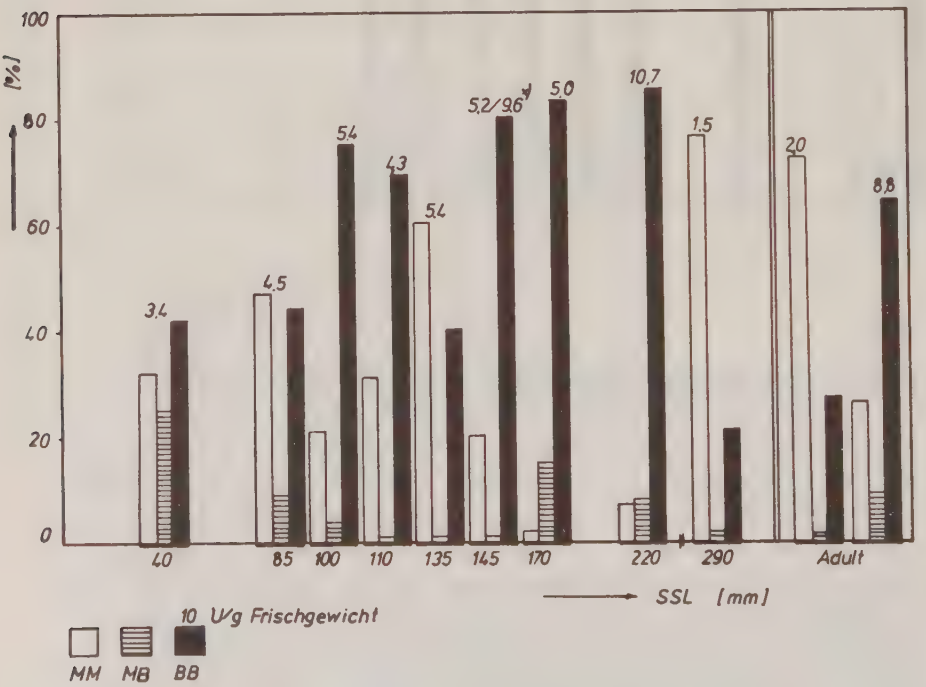


Abb. 27: Prozentuale Verteilung der Isoenzyme der Creatinkinase in der Lunge menschlicher Foeten während der Ontogenese.

* Zwillinge

Nebenniere

Eine kontinuierliche Abnahme von CK-MM im frühen Foetalstudium, die mit einer entsprechenden Zunahme von CK-BB einhergeht und die sich anschließende Abnahme von CK-BB im weiteren Verlauf der Entwicklung, zeichnen das Verteilungsmuster der CK in der Nebenniere von menschlichen Foeten aus (Abb. 28). Die Veränderungen im Isoenzymmuster können durch das Vorliegen unterschiedlicher Gewebearten der Nebenniere bedingt sein, der Rinde mesodermalen und dem Mark ektodermalen Ursprungs. Eine histologisch einwandfreie Deutung ist jedoch noch nicht möglich. Überraschenderweise enthält die foetale Nebenniere eine um das zehnfache höhere CK-Aktivität als die adulte; dieser Unterschied kann daher rühren, daß die untersuchten adulten Proben Autopsiegeweben entnommen wurden.

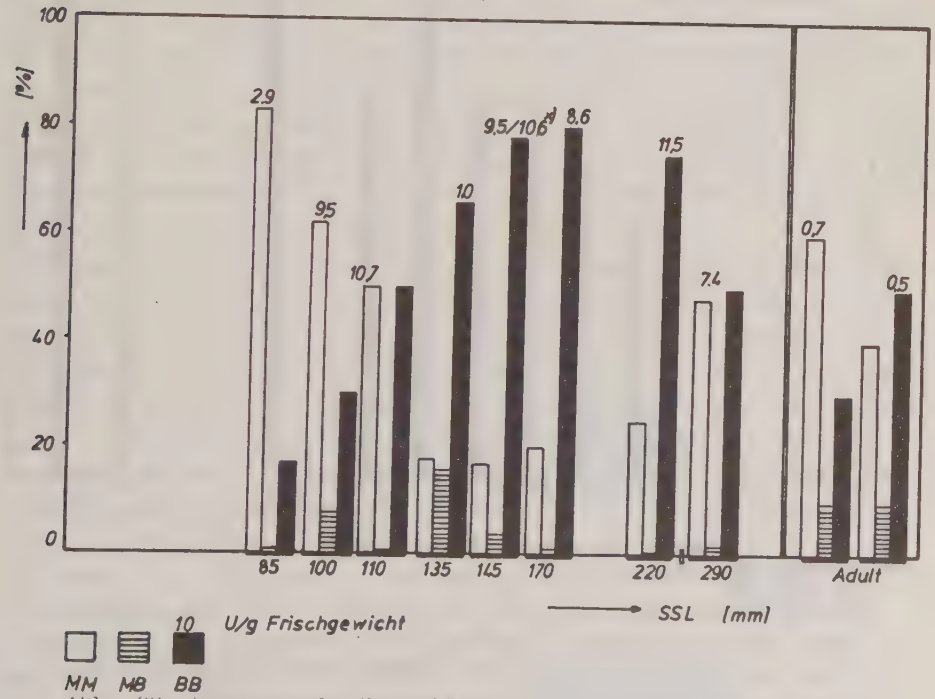


Abb. 28: Prozentuale Verteilung der Isoenzyme der Creatinkinase in der Nebenniere menschlicher Foeten.

* Zwillinge

Niere

Das Verteilungsmuster der sich differenzierenden Niere (Abb. 29) läßt ähnliche Grundzüge erkennen, wie sie bereits bei der Lunge und der Nebenniere besprochen wurden; CK-MM, die in der Niere des 80 mm großen Foeten zu gleichen Anteilen wie CK-BB enthalten ist, verschwindet während der weiteren Entwicklung, wobei das Foetalmuster in das Adulte übergeht. Da in der Foetalperiode, der die untersuchten Foeten angehören, die Vermehrung der Nephrone stattfindet, drücken die Veränderungen im Isoenzymmuster vermutlich die Verminderung des mesenchymalen metanephrogenen Blastems und die Zunahme der epithelialen Ausstattung des Organs aus.

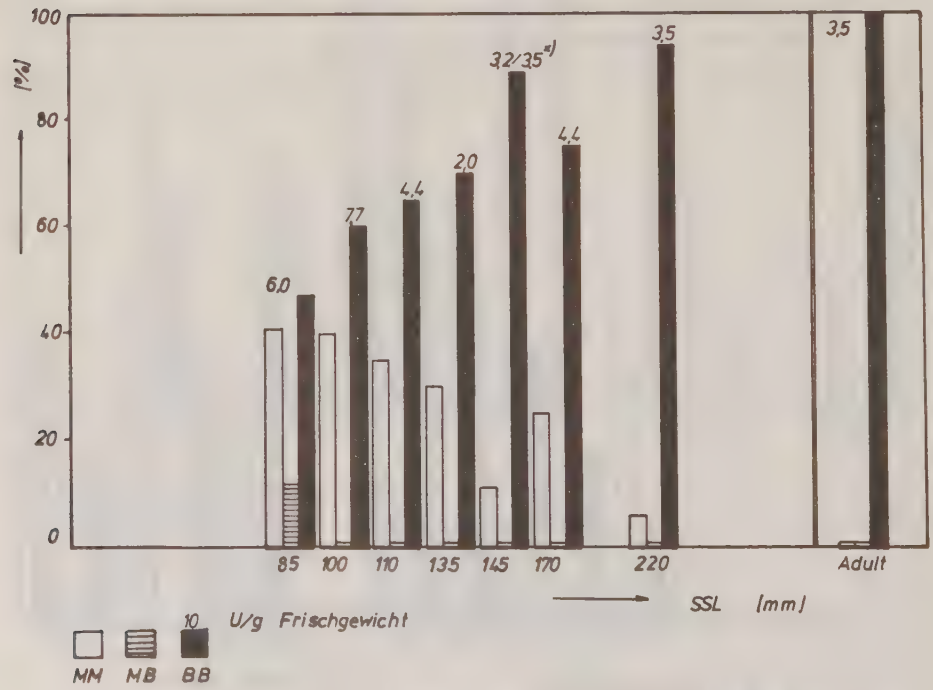


Abb. 29: Prozentuale Verteilung der Isoenzyme der Creatinkinase in der Niere menschlicher Foeten während der Ontogenese.

* Zwillinge

Diskussion

In Übereinstimmung mit den früheren Untersuchungen an Tieren (EPPENBERGER et al., 1964) und an Menschen (CAO et al., 1968) wurde festgestellt, daß das foetale Gehirn ausschließlich den adulten Gehirntyp und gleichzeitig embryonalen Archetyp der Creatinkinase, CK-BB, aufweist, während die Differenzierung des Skelettmuskels mit einer Veränderung des Isoenzymmusters verbunden ist. Das Foetalmuster anderer Organe und Gewebe, in denen CK-BB überwiegt, bleibt während der Ontogenese unverändert und dem Adultmuster gleich (Darm, Magen, Kopfhaut); entsprechend zeigen Organe mit quergestreifter Muskulatur, deren Adultmuster hauptsächlich CK-MM enthält, die für den Skelettmuskel typische Entwicklung des Foetalmusters (Zunge, Diaphragma). Die Feststellung, daß sich die Entwicklung solcher Organe, in deren Adultmuster entweder CK-MM oder CK-BB überwiegt, analog zu der des Skelettmuskels bzw. des Gehirns vollzieht, darf nicht verallgemeinert werden: sie gilt nur für Gewebe und für Organe, die zum größten Teil homogen sind. Organe, die aus unterschiedlichen Gewebearten bestehen, zeigen ein kompliziertes Verteilungsmuster, das vorläufig nur andeutungsweise in eine Beziehung zur Histogenese des betreffenden Organs gebracht werden kann.

Der Übergang vom Foetalmuster zum Adultmuster findet in verschiedenen Organen in unterschiedlichen Stadien der Entwicklung statt. In Organen, die für ihre physiologische Funktion hohe Konzentrationen an CK-MM benötigen, ist die Entwicklung des Foetalmusters mit der Aufnahme der physiologischen Tätigkeit des Organs abgeschlossen; auf diese Weise ist der Befund zu erklären, daß das foetale Herz in einem früheren Entwicklungsstadium das Adultmuster aufweist, als der Skelettmuskel oder die Zunge. In Organen dagegen, worin das Enzym eine geringere physiologische Bedeutung besitzt, verändert sich das Verteilungsmuster parallel zu der histologischen Differenzierung.

Bei den vorliegenden Untersuchungen in adulten und foetalen Organen wurde der Muskeltyp der Creatinkinase zwar in sehr

hohen Konzentrationen im Skelett- und Herzmuskel gefunden, gleichzeitig aber auch in solchen Organen, die durchaus keine Muskulatur enthalten. Im Zusammenhang mit der Frage nach einem allgemeinen Verteilungsprinzip des Isoenzyms deuten die vorgelegten Ergebnisse darauf hin, daß CK-MM ausschließlich in Zellen und Geweben mesodermaler Herkunft existiert; dagegen tritt CK-BB in solchen Geweben auf, die ihren Ursprung in allen drei Keimblättern haben können. Das Vorkommen der Isoenzyme der Creatinkinase ist dadurch an bestimmte Zellen und Gewebe geknüpft und muß daher auch in solchem Zusammenhang betrachtet werden. Myoblasten, Fibroblasten und die Zellen der glatten Muskulatur enthalten CK-BB (TURNER et al., 1974). Findet bei der Entstehung von elastischen Fasern ein ähnlicher Übergang der Isoenzyme, wie bei den Muskelfasern statt? Warum behalten glatte Muskelzellen den embryonalen Typ CK-BB? Im Verteilungsmuster der Nebenniere des 85 mm großen Foeten wurden höhere prozentuale Anteile an CK-MM gefunden als in dessen Skelettmuskel. Differenzieren mesenchymale Zellen früher als Muskelzellen und wann, bzw. in welchen Zellen, entsteht im befruchteten Ei zum erstenmal CK-MM. Die Beantwortung dieser und ähnlicher Fragen bleibt ebenso wie ein endgültiger Beweis für die aufgestellte Hypothese weiteren Untersuchungen vorbehalten.

TEIL D:

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ISOENZYME DER CREATINKINASE IN MENSCHLICHEN TUMOREN UND IN PATHOLOGISCHEN SEREN

Untersuchungen über die Isoenzyme der Creatinkinase in menschlichen Tumoren

Über das Vorkommen der Creatinkinase in Tumoren des Menschen und die Verteilung der Isoenzyme liegen bisher nur spärliche Daten vor (HERSCHKOWITZ und CUMINGS, 1964; KLEINE, 1965 b; RÓNA et al., 1972). Auch die Untersuchungen, über die im folgenden berichtet wird, haben orientierenden Charakter; in erster Linie wurde ein Vergleich zwischen den CK-Aktivitäten und Isoenzymmustern im Tumorgewebe und Normalgewebe angestrebt. Zur Untersuchung gelangten in diesem Zusammenhang maligne und benigne Tumoren der Haut sowie maligne Tumoren anderer Organe.
In Extrakten von Tumorgeweben bereitete die Durchführung der Immuntitration insofern Schwierigkeiten, als bei manchen Tumoren ein Teil der CK-Aktivität (maximal 20% der Gesamtaktivität) auch durch ein Gemisch beider Antiseren nicht präzipitiert wurde; im allgemeinen war dieser Teil ebenso groß wie der Anteil, der auch nach der Fällung mit Antiserum gegen CK-BB im Überstand verblieb. Eine eindeutige Erklärung für dieses Verhalten ist nicht möglich; die Restaktivität kann entweder durch das Vorkommen des mitochondrialen Enzyms oder einer anderen, noch unbekannten Enzymform der Creatinkinase bedingt sein; ferner ist eine Veränderung der Proteinstruktur des Antigens (CK-BB) selbst und eine daher unvollständige immunologische Reaktion mit dem betreffenden Antiserum nicht auszuschließen. Aus diesem Grund wird bei vielen Ergebnissen der aus der Überstandsaktivität nach der Fällung mit Antiserum gegen CK-MM ermittelte Wert angegeben, der dem prozentualen Anteil von CK-BB entsprechen sollte.

Wie Tab. 13 zeigt, unterscheiden sich die meisten der untersuchten Tumoren der Haut sowohl in der CK-Konzentration als auch im Isoenzymmuster von normalen Hautproben kaum: die benignen Geschwülste zeigen im Durchschnitt einen etwas höheren Gehalt des Hybrids, CK-MB, während in malignen Tumoren (Basaliom, Ulcus) und in Keratoma senile (Hornhaut) fast ausschließlich CK-BB gefunden wird. Eine Probe von Naevus

(Muttermal), die gleiche Aktivitätsanteile beider Isoenzyme enthält, und zwei Proben von Naevus-Pigment, in denen CK-MM überwiegt, unterscheiden sich deutlich von diesem Schema.

Tab. 13: CK-Isoenzymverteilung in benignen und malignen Tumoren der Haut

Histologischer Befund und Lokalisation der Probe	CK-Konzentration (U/g Frischgew.)	CK-MM (%)	CK-MB (%)	CK-BB (%)
Normalgewebe				
linke Handfläche	1,7	7	4	89
Ohr	1,5	7	5	88
Axillen (rechts u.links)	1,3	10	-	90
Tumor				
Lokalisation unbekannt	1,0	-	10	90
Lokalisation unbekannt	1,4	7	14	79
Lokalisation unbekannt	2,6	7	10	83
Fibrom				
Abdomen	0,5	-	5	95
Nase	1,7	-	11	89
Kinn	1,4	-	13	87
Nacken	0,6	-	7	93
Fibroma Pendulum	1,0	-	9	91
Naevus				
Lokalisation unbekannt	1,5	41	17	41
Lokalisation unbekannt	1,0	4	15	81
Gesicht	0,9	-	8	92
Gesicht	0,5	-	7	93
Pigment-Naevus				
Gesicht	4,1	71	4	25
Kinn	3,8	65	5	30
Wange	1,5	-	15	85
Wange	0,2	-	10	90

Tab. 13 (Fortsetzung):

Rumpfbasaliom (mons tubis)	2,0	-	6	94
Strahlenulcus (Brust)	0,2	-	9	91
Keratoma senile				
Gesicht	1,02	-	9	91
Stirn	1,02	-	-	100

Die Ergebnisse der Untersuchungen an malignen Tumoren anderer Organe sind in der Tab. 14 zusammengefaßt; zum Vergleich sind dort auch die CK-Konzentration und das Isoenzymmuster des entsprechenden gesunden Organs angegeben. In Gliomen des Großhirns fanden sich zumeist hohe CK-Konzentrationen, wie sie auch im normalen Nervenparenchym vorkommen; dagegen enthielten Neurinom, Neurofibrom und Meningeom, in Übereinstimmung mit HERSCHKOWITZ und CUMINGS (1964), nur eine geringe CK-Aktivität. Die Beobachtung von RONA et al. (1972), nach der in Gehirntumoren (Glioblastomen) CK-MM auftritt, ließ sich nicht bestätigen, da alle untersuchten Proben nur CK-BB enthielten.

Im Magenkarzinom ist der Enzymgehalt gegenüber dem gesunden Gewebe nach KLEINE (1965 b) signifikant erniedrigt, im Rectumkarzinom dagegen erhöht; die eigenen Untersuchungen, denenzufolge in dem einzigen untersuchten Magenkarzinom eine geringere, in vier verschiedenen Rectumkarzinomen aber eine wesentlich höhere CK-Aktivität als im Normalgewebe gefunden wurde, stimmen mit dem Befund von KLEINE überein. Der Enzymgehalt im Colonkarzinom war nicht wesentlich höher als der im Normalgewebe.

Normale humane Mamma enthält keine Creatinkinase. Dagegen enthielten sämtliche untersuchten Mammakarzinome sowie eine

Knochenmetastase das Enzym, und zwar in unterschiedlichen Konzentrationen; die nachgewiesenen CK-Aktivitäten ließen sich fast ausschließlich als von CK-BB herrührend identifizieren. Ein Nierenkarzinom und eine Hirnmetastase enthielten die Creatinkinase in ähnlichen Konzentrationen wie die normale Niere und unterschieden sich dadurch von den Hypernephromen und deren Metastasen. Auch in Bronchialkarzinomen war die Konzentration der CK von der gleichen Größe wie in der normalen Lunge.

Sämtliche Karzinome der Zunge enthielten nicht nur eine viel geringere CK-Konzentration als das Normalgewebe, sondern zeigten auch ein anderes Isoenzymmuster. Bei dem in Tab. 14 zuletzt aufgeführten Excisat, das von normalem Randgewebe nicht befreit war, verfälscht die Skelettmuskulatur der Umgebung mit ihrer hohen CK-MM-Aktivität das mitgeteilte Ergebnis.

Von vier verschiedenen Proben von Hodgkin'Milz enthielten zwei eine etwas geringere CK-Aktivität als gesunde Milz; in den beiden übrigen ließ sich keine Aktivität mehr nachweisen. Das Isoenzymmuster der Proben mit verminderter Aktivität unterschied sich drastisch von der Normalverteilung, welche in Autopsiematerial ermittelt wurde. Da im Falle der Milz, wie bereits angeführt, das Isoenzymmuster von Autopsiegewebe eventuell den Zustand "in vivo" nicht richtig wiedergibt, ist ein direkter Vergleich hier kaum möglich.

In Struma (Kropf) wurde im Gegensatz zu der gesunden Schilddrüse eine geringe CK-Konzentration gefunden; auch in diesem Fall unterschied sich das Isoenzymmuster des Excisats von dem des Normalgewebes.

Tab. 14: CK-Isoenzymverteilung in malignen Tumoren des Menschen (I)

Gewebe Histologischer Befund		CK-Konzentration (U/g Frischgew.)	CK-MM (%)	CK-MB (%)	CK-BB (%)
Großhirn (normal		55-90	-	-	100
Glioblastoma multiforme (Astrocytom)	a)	33,4	-	-	100
	b)	76,5	-	-	100
Glioblastoma multiforme	a)	76,9	-	-	100
	b)	6,1			95
Neurinom	a)	keine			
	b)	0,2		n.b.	
Neurofibrom (Recklinghausen		1,3			91
Meningeom		3,6		n.b.	
Magen (normal		15-23	3	2-6	91-95
Magenkarzinom		1,1			96
Colon (normal		4,8	-	-	100
Colonkarzinom	a)	7,5			90
	b)	5,2			93
Rectum (normal)		3,2	52	-	48
Rectumcarzinom	a)	52,7	4	-	96
	b)	35,9	5	-	95
	c)	32	3	-	97
	d)	17,8	-	-	100
Rectosigmoidkarzinom		0,6	-	-	100

Tab. 14 (Fortsetzung II)

Mamma (normal)		keine Aktivität			
Mammakarzinom	a)	4,6			98
	b)	6,7			96
	c)	1,3			95
	d)	0,2			99
	e)	0,2			90
	f)	0,4	9		90
	g)	0,2	8	-	92
Knochenmetastase		1,2	11		89
Niere (normal)		3,2	-	-	100
Nierenkarzinom		4,1	-	-	100
Hirnmetastase eines Nierenkarzinoms		10	-	-	100
Hypernephrom	a)	0,85	-	8	92
	b)	0,4	-	-	100
Metastase in der Niere		0,15	-	-	100
Netzmetastase		1,5	-	-	100
Lunge (normal)		1,9-8,8	27-78	0-4	22-69
Bronchialkarzinom	a)	1,7			98
	b)	8,3			98
Zunge (normal)		225-292	90-99	1-5	0- 5
"Tumor Transglottic"		1,6			75
Epiglottiskarzinom	a)	2,0			90
	b)	4,9			96
verhorntes Plattenepithelkarzinom mit angrenzender Skelettmuskulatur		45,3	99		

Tab. 14 (Fortsetzung III)

Milz (normal)		0,8	85	-	15
Hodgkin'Milz	a)	0,65	-	-	100
	b)	0,6			91
	c)	keine Aktivität			
	d)	keine Aktivität			
Schilddrüse (normal)		13-34	65-78	0-6	16-35
Struma		4,8			99

Diskussion

Die untersuchten malignen Tumoren des Menschen enthalten die Creatinkinase in Konzentrationen, die ebenso hoch, höher, oder aber niedriger sein können als im entsprechenden gesunden Gewebe. Überraschenderweise gleichen sich alle Tumoren hinsichtlich ihrer Isoenzymausstattung, die - unabhängig von dem Isoenzymmuster des Normalgewebes - ausschließlich CK-BB aufweist. Diese gemeinsame Eigenschaft maligner Tumoren kann insofern im Zusammenhang mit deren histologischer Konstitution gesehen werden, als Karzinome hauptsächlich aus epithelialem Gewebe bestehen. Ausnahmen bilden die zuletzt aufgeführten Proben: Hodgkin'Milz als Entartung des lymphatischen Systems und Struma der Schilddrüse als Wucherung des Bindegewebes.

SCHAPIRA et al. (1968) haben gezeigt, daß der atrophierte und der dystrophische Skelettmuskel eine Verteilung der Isoenzyme der CK aufweisen, die dem Verteilungsmuster des foetalen Muskels ähnlich ist. Die Beobachtung, daß charakteristische Isoenzymmuster und Antigene adulter Zellen verschwinden, während foetale Muster und Formen erscheinen, gilt ganz allgemein für pathologische und insbesondere canceröse Zellen und ist durch die Fehlprogrammierung der Proteinsynthese der Zellen bedingt (WEINHOUSE, 1973).
Es ist daher zu erwarten, daß bei der Karzinogenese von Muskelzellen in Myosarkomen - in vivo wie in vitro - eine Entdifferenzierung im Isoenzymmuster stattfindet, die durch das Verschwinden des Muskeltyps CK-MM und das Auftreten von CK-BB entgegengesetzt der Differenzierung verläuft, die während der Ontogenese beobachtet wird.

Quantitative Bestimmung der Isoenzyme der Creatinkinase im Serum

Das Blutserum enthält eine wenn auch geringe Menge an Creatinkinase, die vom normalen Zerfall der Muskelzellen herrührt. Die Erhöhung der CK-Aktivität im Serum kann eine physiologische Ursache haben,wie im Falle starker Muskelbelastung (KIEF et al., 1972), oder eine pathologische Ursache. So bewirken Muskeltraumen und primäre Myopathien, aber auch eine Reihe anderer Erkrankungen, die mit einer Schädigung der Skelettmuskulatur einhergehen, einen Anstieg der Serum-CK-Aktivität (SZASZ, 1974).

In der klinischen Diagnostik gilt die Erhöhung der CK-Aktivität seit langem als Indikator für einen akuten Herzinfarkt (HESS et al.,1964). Da aber ein breites Spektrum extrakardialer Ursachen besteht, die ebenfalls eine Erhöhung der CK-Aktivität im Serum bewirken,ist die Aussagekraft eines derartigen Befundes allein wenig spezifisch. Eine Unterscheidung zwischen Erhöhungen des Enzymspiegels muskulären oder myokardialen Ursprungs ist dagegen möglich, wenn gleichzeitig auch die Isoenzymverteilung der Creatinkinase ermittelt wird. Im Gegensatz zum Skelettmuskel und allen anderen Organen enthält der Herzmuskel hohe Konzentrationen der Hybridform, CK-MB (vgl. Tab.7, Teil C), so daß das Auftreten des Hybrids im Serum als spezifischer Indikator für Nekrosen der Herzmuskelzellen angesehen werden kann (KONTTINEN und SOMER, 1972 und 1973; WAGNER et al., 1973). Da die Konzentration der CK-Isoenzyme nach der Ausschüttung in das Serum sehr gering ist, bedarf es zu deren Bestimmung einer empfindlichen und spezifischen Methode. Unserer Meinung nach stellt die Immuntitration eine in diesem Sinne geeignete Methode dar.

Mit ihrer Hilfe wurde die Isoenzymverteilung der Creatinkinase in Seren von drei gesunden Probanden, in 31 Seren von 24 Patienten mit diagnostiziertem Herzinfarkt und Seren von 5 Patienten mit stark erhöhter, jedoch nicht infarktbedingter CK-Aktivität, quantitativ bestimmt.

Tabelle 15: CK-Isoenzymverteilung in normalen und pathologischen Seren (I)

	Nr.	Tag*	CK-Gesamtaktivität (U/l)	CK-MM (U/l)	(%)	CK-MB (U/l)	(%)	CK-BB (U/l)	(%)
Normalseren			11	11	100	-	-	-	-
			17	17	100	-	-	-	-
			30	30	100	-	-	-	-
Pathologische Seren									
Intoxikation			214	214	100	-	-	-	-
Verbrennung			8580	8580	100	-	-	-	-
Verbrennung			948	948	100	-	-	-	-
Herzstillstand			3160	3160	100	-	-	-	-
Muskeltrauma			595	595	100	-	-	-	-
Herzinfarkt	1	1	139	118,5	85	20,5	15	-	-
	2	1	40	35,2	88	4,8	12	-	-
	3	1	82	53,3	65	28,7	35	-	-
	4	1	314	251,2	80	62,8	20	-	-
	4	5	47	42,3	90	4,7	10	-	-
	5	1	227	165,5	73	61,5	27	-	-
	6	1	169	135,2	80	33,8	20	-	-
	7	1	112	96,3	86	15,7	14	-	-
	8	1	118	102,7	87	15,3	13	-	-
	9	1	136	122,4	90	13,6	10	-	-
	10	1	227	197.5	87	29,5	13	-	-
	11	1	72	60,5	84	11,5	16	-	-
	12	1	57	46,7	82	10,3	18	-	-
	13	1	1060	837,4	79	222,6	21	-	-
	14	4	66	62,0	94	4	6	-	-
	15	2	384	314,9	82	69,1	12	-	-
	15	4	102	74,5	73	27,5	27	-	-
	15	5	36	29,9	83	6,1	17	-	-

Fortsetzung von Tabelle 15

16	1	32	28,2	88	3,8	12	-	-
17	1	223	171,3	77	51,7	23	-	-
17	2	341	320,5	94	20,5	6	-	-
18	1	269	231,3	86	29,6	11	8	3
19	2	80	76,8	96	3,2	4	-	-
20	1	355	337,2	95	17,7	5	-	-
21	1	239	224,6	94	14,4	6	-	-
22	1	854	708,8	83	145,2	17	-	-
22	3	340	319,6	94	20,4	6	-	-
23	1	92	80	87	12	13	-	-
24	1	405	356	88	49	12	-	-

* Angegeben wird der Tag nach der Einlieferung der Patienten, an dem Blut entnommen wurde.

Tab. 16: CK-Isoenzymverteilung in Herzinfarktseren

CK-Gesamtaktivität Bereich (U/l)	N	Mittelwert (U/l)	CK-MM (U/l)	CK-MM (%)	CK-MB (U/l)	CK-MB (%)
35 - 100	10	60,4	51,4	85,2	8,9	14,8
100 - 200	6	129	108,2	83,7	21,0	16,3
200	15	402,4	340,9	84,7	60,9	15,2

In den Normalseren ebenso wie den pathologischen Seren mit stark erhöhter, nicht infarktbedingter CK-Aktivität ließ sich ausschließlich der Muskeltyp, CK-MM, nachweisen (Tab. 15), während alle Herzinfarktseren neben diesem Isoenzym noch das Hybrid CK-MB enthielten. Eine geringe Aktivität von 3% des Gehirntyps CK-BB wurde in einem Herzinfarktserum mit 269 U/l Gesamtaktivität nachgewiesen. Wie der Tab. 16 entnommen werden kann, lag der mittlere Aktivitätsanteil des Hybrids sowohl in Seren mit niedriger als auch in Seren mit stark erhöhter CK-Aktivität bei 15%. Eine Korrelation zwischen der CK-Gesamtaktivität des Serums und der Aktivität des Hybrids am 1. oder 2. Kliniktag wurde nicht beobachtet. Der höchste Wert für CK-MB, der in einem Serum mit 82 U/l Gesamtaktivität gemessen wurde, war 35%. Mittlerer und höchster Aktivitätsanteil des Hybrids, ermittelt mit Hilfe der Immuntitration, stimmen mit den in der Literatur angegebenen, auf andere Weise bestimmten Werten (KONTTINEN und SOMER, 1973; WAGNER et al., 1973) gut überein.

Die prozentualen Anteile der CK-Isoenzyme an der Gesamtaktivität des Enzyms im adulten Herzmuskel betragen 84% CK-MM, 15% CK-MB und 1% CK-BB (vgl. Tab. 7, Teil C); eine entsprechende Verteilung weisen auch die als Folge eines Herzinfarktes ins Serum ausgeschütteten Isoenzyme auf (Tab. 15 und 16).

Mitochondriale Creatinkinase ließ sich in Herzinfarktseren nicht nachweisen; diese Beobachtung ist aber nicht auf die geringe Konzentration des Enzyms im Herzmuskel, wie von anderen Autoren behauptet wird (SOMER et al., 1974), zurückzuführen, sondern eher auf seine schnelle Inaktivierung im Serum.

Diskussion

Die quantitative und zuverlässige Bestimmung der Hybridform der Creatinkinase im Serum, wie sie durch die Immuntitration ermöglicht wird, ist von großer klinischer Bedeutung. Nach LIMBIRD (1973) ließ sich aufgrund des Nachweises von CK-MB bei einer großen Anzahl von Patienten (34% von 328 Probanden) ein Herzinfarkt diagnostizieren, der mit dem EKG-Bild und anderen Mitteln nicht erfaßt werden konnte. Die Konzentration von CK-MB im Serum bildet einen direkten Gradmesser für die Anzahl der geschädigten Herzmuskelzellen; als solcher erlaubt sie eine Aussage über das Ausmaß des Infarktes und ermöglicht eine Prognose für den Ausgang der Erkrankung. Aus dem zeitlichen Verlauf der CK-MB-Aktivitätskurve nach der Schädigung können ferner eine Reinfarktion bzw. das Abklingen des Infarktes erkannt werden.

Im Anschluß an die Untersuchungen von KONTTINEN (1972) und SOMER, die das spezifische Auftreten des Hybrids in Herzinfarktseren zum Gegenstand hatten, wurden mehrere Versuche zur Erarbeitung empfindlicher Verfahren für die Bestimmung der Isoenzyme der CK unternommen. Die daraufhin betriebene Agarosegel- oder Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SOMER und KONTTINEN, 1972 a; ANIDO et al., 1974) mit anschließender Tetrazoliumanfärbung der Isoenzyme und die von MERCER (1974) entwickelte chromatographische Methode erlauben eine quantitative Bestimmung jedoch nur in Seren mit hoher CK-Aktivität. Die an sich empfindlichere Auswertung der Isoenzymbanden im Fluoreszenztest nach elektrophoretischer Auftrennung auf Agarosegel ist mit einer beträchtlichen Ungenauigkeit behaftet (SOMER und KONTTINEN, 1972 b; ROE et al., 1972), so daß für eine genauere Bestimmung die Elution der einzelnen Isoenzymbanden unumgänglich ist (ROBERTS et al., 1974). Ein solches Verfahren erfordert aber einen großen apparativen und zeitlichen Aufwand, der es für den klinischen Routinetest ungeeignet macht.

Durch die erfolgreiche Anwendung auf pathologische Seren hat sich die Immuntitration als eine Methode erwiesen, die auch

bei niedrigen CK-Aktivitäten einen empfindlichen Nachweis des herzinfarktspezifischen Hybrids CK-MB erlaubt; eine noch nicht ganz beseitigte, nicht allzu gewichtige Ungenauigkeit, die sich vor allem bei kleinen Mengen des Hybrids nachteilig auswirkt (s.a. Teil B), sollte durch die Verwendung von Immunadsorbentien und von markierten Antikörpern eliminiert werden können.

Ein Teil der in dieser Arbeit vorliegenden Untersuchungsergebnisse wurde bereits in etwas abgeänderter Form veröffentlicht:
E. Jockers-Wretou and Gerhard Pfleiderer "Quantitation of creatine kinase isoenzymes in human tissues and sera by an immunological method" Clin.Chim. Acta 58, 223 (1975)

E. Jockers-Wretou, K. Grabert und G. Pfleiderer "Quantitative immunologische Bestimmung der Isoenzyme der Kreatinkinase im Serum" Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. (1975) im Druck.

MATERIAL UND METHODEN

Organmaterial

Tierisches Gewebe wurde kurz nach dem Töten der Tiere eisgekühlt zum Institut transportiert und dort sofort bearbeitet.

Bei den normalen Humangeweben, aus denen die einzelnen Formen der CK isoliert wurden und die bei der Immuntitration zur Untersuchung gelangten, handelt es sich um Autopsiematerial, das uns von den Pathologischen Instituten des Krankenhauses Bergmannsheil Bochum und des Klinikums Essen zur Verfügung gestellt worden war. Es wurde 12 bis 24 Stunden post mortem entnommen und bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt; bei einzelnen Proben, wo dieses nicht der Fall war, ist es besonders vermerkt.

Menschliche Foeten wurden uns von der Frauenklinik des Klinikums Essen überlassen; sie wurden kurz nach dem Eingriff eingefroren und bis zur Obduktion tiefgekühlt aufbewahrt. Die einzelnen Organe wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Organe älterer Foeten wurden uns von der Kinderklinik der Universität Bonn zur Verfügung gestellt.

Bei den untersuchten Hautproben handelt es sich um Operationsmaterial, das uns von der Klinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten der Städtischen Krankenanstalten Nürnberg überlassen wurde.
Tumorgewebe, das histologisch geprüftem Operationsmaterial entnommen war, stammt aus den Chirurgischen Abteilungen verschiedener Krankenhäuser: St. Josefs-Hospital Bochum, Knappschaftskrankenhaus Bochum-Langendreer, Klinikum Essen und Nordwest-Krankenhaus Frankfurt. Alle Proben wurden nach der Entnahme eingefroren und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Serumproben

Pathologische Seren, die uns die Abteilung für Innere Medizin der Krankenhäuser "Bergmannsheil" und "Augusta" in Bochum zur Verfügung stellten, wurden jeweils einige Stunden nach der Blutentnahme untersucht, um etwaige Änderungen im Isoenzymmuster durch Aufbewahrung oder Einfrieren auszuschließen.
Normalseren stammen von Institutsangehörigen.

Organextrakte

Gewebeproben wurden im Verhältnis 1:2 bis 1:3 mit Tris/HCl Puffer, pH 8,0 (0,05 M Tris, 0,001 M EDTA, 0,010 M KCl und 0,02 M 2-Mercaptoäthanol) im Ultra-Turrax unter Kühlung zerkleinert (Ikawerk, Staufen) und anschließend im Potter-Elvehjem-Homogenisator zerrieben. Das Homogenat wurde 30 min lang bei 40000 x g zentrifugiert (Sorvall RC 2B); zur Verwendung gelangte der fettfreie Überstand.
Bei manchen Foetalorganen und Excisaten, wo nur wenig Organmaterial zur Verfügung stand (minimal 50 mg), wurde dies mit 1,0 - 1,5 ml Extraktionspuffer aufgenommen und nur im Potter-Elvehjem homogenisiert.

Aktivitätsmessung

a) Bestimmung mit Creatin als Substrat (Hinreaktion)

Die Methode lehnt sich an die Angaben von TANZER und GILVARG (1959) an. Hilfs- und Indikatorenzyme sind Pyruvatkinase (PK) und Lactatdehydrogenase (LDH).
Meßprinzip:

$$\text{Creatin} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{CK}} \text{Creatinphosphat} + \text{ADP}$$

$$\text{ADP} + \text{PEP} \xrightarrow{\text{PK}} \text{ATP} + \text{Pyruvat}$$

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Lactat} + \text{NAD}^+$$

Gemessen wurde die Abnahme der NADH-Konzentration bei 366 nm pro Zeiteinheit, die der CK-Aktivität äquivalent ist; die Extinktionsdifferenz bis zu einer Abnahme von 0,5 pro Minute war der eingesetzten Enzymmenge direkt proportional. Die Messungen erfolgten im Photometer Eppendorf mit Thermoküvette bei 25°C. Im Testansatz (Gesamtvolumen 2 ml bzw. 0,5 ml) lagen in 200 mM Glycin-Puffer, pH 9,0, folgende Endkonzentrationen vor: 4 mM ATP; 4 mM Mg-Acetat; 0,39 mM Phosphoenolpyruvat; 0,35 mM NADH; 10 mM Glutathion (GSH); 33 mM Creatin und pro ml Testansatz 15 U LDH und 8 U PK. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Creatinkinase gestartet; Küvetten ohne Creatin dienten als Leerwert.
Der Test in der Hinreaktion der CK wurde bei der Isolierung der Isoenzyme vom Schwein sowie der Isolierung der Hybrid- und der mitochondrialen Form aus Humanherz verwendet. CK-Aktivitäten, die in der Hinreaktion gemessen wurden, sind im Text besonders vermerkt.

b) Bestimmung mit Creatinphosphat als Substrat (Rückreaktion)

Im allgemeinen wurde die CK-Aktivität in der Rückreaktion nach OLIVER (1955) mit Hexokinase (HK) und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6pDH) als Hilfs- bzw. Indikatorenzyme bestimmt.
Meßprinzip:

$$\text{Creatinphosphat} + \text{ADP} \xrightarrow{\text{CK}} \text{Creatin} + \text{ATP}$$

$$\text{Glucose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{HK}} \text{Glucose-6-Phosphat} + \text{ADP}$$

$$\text{Glucose-6-Phosphat} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{G6pDH}} \text{6-Phosphogluconat} + \text{NADPH} + \text{H}^+$$

Es wurde die Zunahme der Extinktion bei 366 nm und 25°C gemessen, die bis zu einem Wert von 0,030 pro Minute der eingesetzten CK linear proportional ist (SZASZ et al.,1970). Die verwendete Testlösung "Monotest CPK aktiviert" von Boehringer Mannheim enthielt in 0,5 ml Gesamtvolumen die Substrate in folgenden Endkonzentrationen: 0,1 M Triäthanolamin-Puffer, pH 7,0; 20 mM Glucose; 10 mM Mg-Acetat; 1,0 mM ADP; 10 mM AMP; 0,6 mM $NADP^+$; 35 mM Creatinphosphat; 9 mM GSH; 10 µg HK und 5 µg G6pDH.

Bei der Bestimmung der CK-Aktivität in Rohextrakten wurde die Testlösung "CPK aktiviert" der gleichen Firma verwendet; ein Testgemisch, das kein Creatinphosphat enthielt, diente als Leerwert.

Proteinbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden nach der Biuretmethode (BEISENHERZ et al., 1953) in einer geringfügig modifizierten Form bestimmt: die Niederschläge der Trichloressigsäurefällung wurden in 1 ml Biuretreagens gelöst, nach halbstündigem Stehenlassen mit 1 ml aqua dest. verdünnt und bei 546 nm gemessen (Schichtdicke der Küvette = 2 cm). Der Biuretfaktor betrug 3,6; er wurde durch Einwaage und Proteinbestimmung der lyophilisierten CK aus Kaninchenmuskel ermittelt.

Ammoniumsulfatfällung

Die Ammoniumsulfatmenge, die für das Erreichen einer bestimmten Sättigung notwendig war, wurde nach BEISENHERZ et al. (1953) mit Hilfe der Formel

$$\frac{1{,}77 \times \text{Sättigungszunahme}}{3{,}42 - \text{Endsättigung}} = \text{g } (NH_4)_2\,SO_4 \text{ /ml}$$

berechnet. Sie gilt nur bei $0^{\circ}C$; 100% Sättigung entspricht dem Sättigungsgrad 1.

Dialyse und Konzentrierung

Proteinlösungen wurden in Visking-Dialyseschläuchen gegen ausreichende Puffervolumina (bei $4^{\circ}C$) auf dem Magnetrührer dialysiert. Je nach dem Volumen der zu dialysierenden Lösungen wurden die Puffer mindestens einmal gewechselt.

Kleine Volumina von Proteinlösungen (bis 100 ml) wurden mittels Ultrafiltration konzentriert und dabei - soweit

erforderlich - dialysiert. Die Ultrahülsen (UH mit einer Trenngrenze von 20000 Dalton) und die Ultrahülsenapparatur stammten von Schleicher und Schüll, Dassel.

Elektrophorese auf Celluloseacetat-Folien

Die Elektrophoresen wurden auf 25,5 x 145 mm großen Celluloseacetat-Folien (Fa. Macherey, Nagel & Co) in der Boskamp-Mikrophor-Apparatur bei einer Spannung von 200 Volt durchgeführt. Der Elektrodenpuffer war 0,03 M Veronal/HCl, pH 8,6, die Elektrophoresedauer betrug 60 min. War die Elution der einzelnen Isoenzyme nach der elektrophoretischen Auftrennung beabsichtigt, so wurde 1/ul des Extraktes aufgetragen. Von mehreren (2-4) parallel behandelten Folien wurde eine zur Lokalisierung der Aktivitätsbanden enzymspezifisch angefärbt,während nach diesem Muster aus den anderen die Aktivität tragenden Zonen ausgeschnitten und in 0,2 ml Standardpuffer (0,05 M Tris/HCl,pH 8,0, 0,001 M EDTA, 0,020 M 2-Mercaptoäthanol) eluiert wurden. Anschließend wurde in aliquoten Teilen des Eluats die CK-Aktivität gemessen.

Enzymspezifische Anfärbung der Creatinkinase

Die Färbelösung enthielt in 15 ml 0,1 M Tris/HCl Puffer, pH 7,2, folgende Endkonzentrationen der Substrate: 10 mM Glucose; 1 mM ADP; 0,3 mM NADP; 2 mM Creatinphosphat; 10 mM Magnesiumacetat; 2 mg GSH; je 20 g HK und G6pDH; 10 mg 3(4,5 Dimethylthiazolyl-2-) 2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) und einige Körnchen Phenaziniummethosulfat. Die bei 50°C thermostatisierte Färbelösung wurde mit 5 ml flüssiger 1,6%iger Agarose (in 0,015 M Veronal/HCl Puffer, pH 8,6) gemischt und auf Objektträger gegossen. Die Celluloseacetat-Folien wurden mit der Auftragseite blasenfrei auf die Gele gelegt und in der Dunkelheit inkubiert. Folien, die mit einem Färbeansatz ohne Creatinphosphat inkubiert wurden, dienten als Kontrolle.

Anzufärbende Immundiffusionsplatten wurden mit diesem Färbe-

gel überschichtet; es ließ sich nach beendeter Färbung leicht abwaschen, ohne daß die Agaroseplatten zerstört wurden.

Immunisierung

Antiseren gegen CK-MM vom Schwein sowie gegen die menschliche Isoenzyme CK-MM und CK-BB wurden in Kaninchen erzeugt. Dazu erhielt die Tiere eine Primärinjektion von 4 - 5 mg Antigen in Emulsion mit komplettem Freundschem Adjuvans in die Fußballen einer der beiden Hinterläufe (intraplantar). Eine Sekundärinjektion von annähernd der gleichen Dosis wurde nach 2 Wochen subkutan und intradermal in den Rücken gegeben; nach weiteren zwei Wochen erfolgte eine dritte Injektion auf die gleiche Weise. Die Booster-Injektion von der gleichen Antigenmenge wurde 4-5 Wochen nach der dritten Injektion intravenös gegeben. 6-7 Tage später wurde den Tieren Blut entnommen. Weitere Blutentnahmen erfolgten in Abständen von 5 Wochen nach vorangegangener Booster-Injektion. Gegen CK-MM vom Schwein wurden 6 Kaninchen, gegen menschliche CK-MM und CK-BB jeweils 5 Tiere verschiedener Rassen immunisiert.

Die Immunisierung von Puten (4) und Kaninchen (10 Tiere) gegen CK-BB vom Schwein erfolgte in der gleichen Weise. Zusätzlich wurden 4 Kaninchen nach der Methode von PLESCIA et al. (1964) immunisiert: zwei ml CK-BB (0,5 mg/ml) wurden durch Zugabe von 4 ml methyliertem Rinderserumalbumin (10 mg/ml in aqua dest.) gefällt; die in komplettem Freundschem Adjuvans emulgierte Suspension wurde in der üblichen Weise immunisiert. Die Immunisierung der Tiere gegen das freie sowie gegen das komplexierte Antigen blieb ohne Erfolg.

Antiseren

Antiseren, die in der Immundiffusion eine kleinere Antigenbindungskapazität als 50/ug Antigen pro ml zeigten, wurden verworfen. Sowurden nur die Antiseren von zwei gegen CK-MM vom

Schwein immunisierten Tieren weiterverwendet; von den Antiseren gegen Human-CK-MM bzw. Human-CK-BB waren solche von drei bzw. von zwei Tieren verwendbar.

Antiseren aus mehreren Blutentnahmen wurden gemischt und durch Membranfiltration bis zur Hälfte des Anfangsvolumens konzentriert. Die eigene CK-Aktivität der Antiseren ließ sich anschließend durch Erhitzen bei 60°C (5 min) eliminieren. Die Bestimmung der Antigenbindungskapazität der so erhaltenen Antikörperpräparation erfolgte in der quantitativen Präzipitation von HEIDELBERGER und KENDALL in der Modifizierung von SCHULTZE und SCHWICK (1959).
Sämtliche Antiseren wurden in gefrorenem Zustand bei -20°C aufbewahrt und jeweils kurz vor dem Gebrauch aufgetaut.

Quantitative Präzipitation nach HEIDELBERGER und KENDALL

Eine Reihe von Antigenlösungen, die das Antigen in steigender Konzentration enthielten, wurden mit dem jeweiligen Antiserum inkubiert. Dabei wurden je 0,2 ml der Antigenlösung in Standardpuffer (0,05 M Tris/HCl, pH 8,0, 0,001 M EDTA, 0,02 M 2-Mercaptoäthanol) mit 0,2 ml Antiserum gemischt, 30 min bei Raumtemperatur belassen und über Nacht bei 4°C aufbewahrt.
Nach dem Aufwirbeln des Präzipitats erfolgte die Bestimmung der Präzipitatmenge nephelometrisch in einer Mikroküvette (d=1 cm) im Photometer Eppendorf bei 578 nm. Als Blindwert diente ein Ansatz aus 0,2 ml des gleichen Antiserums mit 0,2 ml Standardpuffer. Aus dem Maximum der Trübungskurve wurde diejenige Antigenmenge ermittelt, die von einem ml des untersuchten Antiserums gebunden wurde. Für das Antiserum gegen CK-MM vom Schwein betrug sie 70/ug Antigen pro ml Antiserum. Die Bindungskapazität der Antiseren gegen die humanen Isoenzyme war 150/ug (54,2 U) CK-MM pro ml Anti-CK-MM bzw. 100/ug (30 U) CK-BB pro ml Anti-CK-BB.

Doppeldiffusion nach OUCHTERLONY (1962)

10 ml flüssige, bei 50°C thermostatisierte Agaroselösung (0,8% in 0,015 M Veronal/HCl Puffer, pH 8,6, 0,1 % NaN_3) wurde in Plastikschalen (Falcon Plastic, Typ 60x15 mm) ausgegossen. Frühestens eine Stunde nach dem Erstarren des Gels erfolgte das Einfüllen der Antigene und Antiseren in die Insertionsstellen (3 mm bzw. 4 mm Durchmesser). Die Diffusion dauerte bei Zimmertemperatur mindestens zwei Tage. Zwei weitere Tage wurde in 0,9% NACl/0,1% NaN_3-Lösung gewaschen, dann wurde enzymspezifisch angefärbt und getrocknet.

Zweidimensionale Immunelektrophorese nach LAURELL (1966)

Waagrecht einjustierte Glasplatten (65mm x 65 mm bzw. 65 mm x 100 mm) wurden an einer Seite mit einem 1,5 cm breiten Streifen aus Agaroselösung (0,8% in 0,015 M Veronalpuffer pH 8,6, 0,1 % NaN_3) beschichtet (2 bzw. 3 ml Agaroselösung). Die Antigene wurden in die Insertionsstellen nahe der Kathode eingetragen und 30 min einer Elektrophorese bei 250 Volt unterworfen. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die bei 50°C thermostatisierte Agarose mit dem Antiserum gemischt und auf die übrige Glasfläche ausgegossen (5 bzw. 7 ml Antikörpergel). Anschließend wurde senkrecht zu der ersten Richtung mindestens 12 Stunden unter Kühlung bei 100 Volt elektrophoriert. Der Elektrodenpuffer war wie bei der Elektrophorese in der ersten Dimension 0,03 M Veronal/HCl Puffer, pH 8,6. Die fertigen Präparate wurden 2 Tage in 0,9%/0,1% NaN_3-Lösung gewaschen, danach enzymspezifisch angefärbt und getrocknet.

Hemm- und Präzipitationstest

Vor der Durchführung des Testes wurde sichergestellt, daß Antiseren sowie Seren nicht immunisierter Tiere keine eigene CK-Aktivität enthalten. Die Anwesenheit von 2-Mercaptoäthanol (0,01- 0,02 M Endkonzentration) erwies sich als notwendig zum Schutz der Antigene während der Inkubation.

Die einzelnen Isoenzyme wurden in Eppendorf-Gefäßen mit dem jeweiligen Antiserum in Mengenverhältnissen, wie sie den Legenden zu den Abbildungen entnommen werden können, gemischt, 30 min bei Raumtemperatur und 30 min bei 4°C inkubiert. Die angegebenen Antigenmengen wurden jeweils in 100/ul Standardpuffer (0,05 M Tris/HCl, pH 8,0, 0,001 M EDTA und 0,02 M 2-Mercaptoäthanol) eingesetzt. Das Gesamtvolumen der Ansätze war innerhalb einer Reihe konstant; zum Auffüllen wurde - soweit notwendig - Standardpuffer verwendet. Die Hemmung durch Antiserum wurde bestimmt, indem den Gefäßen ein aliquoter Teil von 10/ul entnommen und auf die vorhandene Aktivität hin untersucht wurde. Anschließend erfolgte Zentrifugation des Rests (Eppendorfzentrifuge 3200, 4 min). Aus dem Überstand ließ sich durch die Entnahme eines weiteren aliquoten Teils von 10/ul in gleicher Weise die verbliebene Restaktivität bestimmen. Als Kontrollen (100% Restaktivität) dienten parallele Ansätze mit gleichen Volumina der betreffenden Antigenlösungen und gleichen Volumina von Seren nicht immunisierter Tiere, die in Analogie zu den Antiseren aufbereitet worden waren.

Immuntitration

Aliquote Mengen des zu untersuchenden Organextraktes (in 0,05 M Tris/HCl Puffer, pH 8,0, 0,010 M KCl, 0,001 M EDTA und 0,02 M 2-Mercaptoäthanol) wurden mit jedem der folgenden 5 Ansätze in Eppendorf-Gefäßen 30 min bei Raumtemperatur und 30 min bei 4°C inkubiert:

1. 50/ul Standardpuffer
2. 50/ul Serum nicht immunisierter Tiere
3. 50/ul Anti-CK-MM
4. 50/ul Anti-CK-BB
5. 50/ul Anti-CK-MM und Anti-CK-BB

Anschließend wurde zentrifugiert (Eppendorfzentrifuge 3200, 4 min) und die CK-Aktivität im Überstand gemessen. Das

Volumen des Extrakts, das bei der Inkubation eingesetzt wurde, und das in den Testansatz pipettierte Volumen des Überstands richteten sich nach der CK-Aktivität des Extrakts und können der folgenden Aufstellung entnommen werden:

CK-Aktivität im Extrakt (U/l)	Volumen des Extrakts im Inkubationsansatz (µl)	Volumen des Überstands im Testansatz (µl)
100	100	80-100
100-200	50	80- 40
200-400	50	40- 20
400-800	50	20- 10

Extrakte mit einer höheren CK-Aktivität wurden mit Standardpuffer auf 400-800 U/l verdünnt.
Die Aktivität im Überstand von Ansatz 2 gilt als Bezugswert für die übrigen Ansätze. Durch Vergleich mit Ansatz 1 wird sichergestellt, daß keine unspezifische Hemmung durch Serum nicht immunisierter Tiere eintritt. Die Aktivität im Überstand von Ansatz 3 stellt den Gehalt des Extraktes an CK-BB dar; der Gehalt an CK-MM ergibt sich aus der Restaktivität im Überstand von Ansatz 4. Der Unterschied zwischen der Gesamtaktivität des Extraktes (Ansatz 2) und der Summe der gemessenen Werte entspricht dem Anteil des Hybrids CK-MB. Als zusätzliche Kontrolle dient der Ansatz 5, der mit Ausnahme der Organextrakte, die das mitochondriale Enzym enthalten, keine Aktivität zeigen sollte.

Normale sowie pathologische Seren wurden zur Reaktivierung und zum Schutz der Creatinkinase mit 2-Mercaptoäthanol versetzt (Endkonzentration 0,020 M) und nach 30-60 min auf ihre vorhandene Aktivität hin untersucht. Die Immuntitration erfolgte mit aliquoten Volumina des zu untersuchenden Serums in der gleichen Weise, wie es für die Organextrakte beschrieben wurde.

Die Durchführung der Immuntitration mit Hilfe von Antiseren, die in Ziegen bzw. Hammeln gewonnen wurden (Dr. Lang, Firma

Merck, Darmstadt), erfolgte in Gegenwart von Polyäthylenglykol (PEG, Endkonzentration 3%), das sich für die quantitative Präzipitation der Antigen-Antikörperkomplexe als notwendig erwies. Dazu wurden aliquote Mengen der zu untersuchenden Extrakte und Seren mit den folgenden Ansätzen in Eppendorf-Gefäßen 60 min bei 37°C und 12 h bei 4°C inkubiert:

1. 20 µl PEG-Lösung * + 10 µl Standardpuffer
2. 20 µl PEG-Lösung + 10 µl Serum nicht immunisierter Ziegen
3. 20 µl PEG-Lösung + 10 µl Anti-CK-MM (Ziegenserum)
4. 20 µl PEG-Lösung + 10 µl Anti-CK-BB (Hammelserum)
5. 20 µl PEG-Lösung + 10 µl Anti-CK-MM + Anti-CK-BB

Anschließend wurde zentrifugiert und die CK-Aktivität im Überstand gemessen.
Die Antiseren von Ziegen und Hammeln gelangten bei der Immuntitration von foetalen Organen und von Karzinomen zur Anwendung.

* 12% PEG in phosphatgepufferter Saline (=M/15 Phosphatpuffer, pH 7,2 und 0,9% NaCl-Lösung im Verhältnis 1:1)

Bezugsquellennachweis für Reagentien und Enzyme

Von den einzelnen Firmen wurden die nachstehenden Reagentien bezogen:

Boehringer & Söhne GmbH, Mannheim:
Creatinkinase aus Kaninchenmuskel, lyophilisiert;
Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel (PK), (AS-Suspension);
Lactatdehydrogenase aus Schweineherz (LDH), (AS-Suspension);
Hexokinase aus Hefe (HK), (AS-Suspension);
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus Hefe (G6pDH), (AS-Suspension);
Adenosintriphosphat (ATP);
Adenosindiphosphat (ADP);
Adenosinmonophosphat (AMP);
Creatinphosphat;
Phosphoenolpyruvat (PEP);
Nicotinamidadenindinucleotid, reduziert (NADH);
Nicotinamidadenindinucleotid-phosphat, oxydiert ($NADP^+$);

SERVA Feinbiochemica, GmbH, Heidelberg:
Glucose;
Glutathion, reduziert (GSH);
methyliertes Rinderserumalbumin, reinst;
Creatin;
MTT;
Phenaziniummethosulfat;
sämtliche Reagentien für die Disk-Elektrophorese;

E.MERCK AG., Darmstadt:
Polyäthylenglykol 60000 zur Synthese;
und sämtliche Laborchemikalien;

Behringwerke AG., Marburg:
Agarose;
Anti-Kaninchen-γ-Globuline;

Difco Laboratories, Detroit:
Freundsches Adjuvans, komplett;

ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

1. Die Isoenzyme MM und BB der Creatinkinase wurden aus Schweine- und Humanmuskel bzw. aus Schweine- und Humanhirn in kristalliner Form rein dargestellt. Elektrophoretischen und immunologischen Kriterien zufolge waren die vier Enzympräparationen frei von anderen Proteinen. Aus Humanherz wurden das Hybrid CK-MB und das mitochondriale Enzym CK_m isoliert. CK_m stellt ein Oligomeres von Untereinheiten dar, die das gleiche Molekulargewicht aufweisen wie M und B; sein Anteil an der Gesamtaktivität des Herzextraktes betrug bei Autopsiegewebe 23% (Hinreaktion) bzw. 11,5 % (Rückreaktion).

2. Antiserum gegen CK-MM vom Schwein hemmte und präzipitierte CK-MM aus Humanmuskel ebenso gut wie das homologe Antigen CK-MM aus Schweinemuskel. Gegen CK-BB vom Schwein konnten Antikörper nicht gewonnen werden.

Antiserum gegen Human-CK-MM hemmte die CK-MM vom Schwein zwar weitgehend, präzipitierte das Enzym aber nicht; dagegen wurde CK-BB vom Schwein durch Antiserum gegen den humanen Gehirntyp zu 90% gefällt.

3. Antiseren gegen Human-CK-MM und Human-CK-BB reagierten spezifisch mit den entsprechenden homologen Antigenen und präzipitierten diese vollständig. CK-MB wurde von jedem Antiserum zu 90% präzipitiert während CK_m mit keinem Antiserum reagierte.

4. Die mit einem bestimmten Antiserum vollständige Präzipitation der homologen und der hybriden Formen und die fehlende Reaktion der heterologen Form der Creatinkinase lieferten ein Kriterium, mit dessen Hilfe im Isoenzymgemisch die einzelnen Formen quantitativ bestimmt werden konnten. Das Verfahren (Immuntitration) wurde an künstlichen Gemischen erprobt und auf seine Reproduzierbarkeit hin untersucht.

5. Mit dieser Methode wurden typische Verteilungsmuster der CK-Isoenzyme in verschiedenen Organen von Adulten ermittelt.

CK-MM wurde in hohen Konzentrationen in Skelett- und Herzmuskulatur und in geringen Mengen in fast allen anderen Organen mit Ausnahme des ZNS und der Hypophyse gefunden.

Das Hybrid CK-MB ließ sich ebenfalls in mehreren Organen nachweisen. Seine höchste Konzentration besitzt es im Herzmuskel.

CK-BB ist in hohen Mengen im ZNS vertreten und im übrigen ubiquitär.

6. Daneben wurden CK-Isoenzymmuster einzelner Organe während der Foetalentwicklung verfolgt. Es zeigte sich, daß das Verteilungsmuster von solchen Organen, die wie das Gehirn überwiegend CK-BB enthalten (Darm, Magen und Kopfhaut) im Verlauf der Ontogenese unverändert und dem Adultmuster gleich bleibt.

Quergestreifte Muskulatur (Skelettmuskel, Zunge und Diaphragma) und Herzmuskulatur zeigen eine der ontogenetischen Entwicklung parallele Änderung des Enzymmusters, wobei CK-BB und CK-MB zunehmend durch den Muskeltyp ersetzt werden, bis das Adultmuster erreicht ist.

Histologisch inhomogene Organe (Lunge, Nebenniere und Niere) weisen ein kompliziertes Foetalmuster auf, das im Falle der Niere allmählich in das Adultmuster übergeht. Es wurde versucht, einen Zusammenhang zwischen der Histogenese der Organe und ihrem jeweiligen Foetalmuster herzustellen.

7. Von den gleichfalls mit Hilfe der Immuntitration untersuchten Tumoren unterschieden sich benigne Tumoren der Haut kaum von den normalen Hautproben (Ausnahme: Naevus und Naevus Pigment).
In malignen Tumoren und Keratoma senile wurde fast ausschließlich CK-BB gefunden.

8. Karzinome enthielten die Creatinkinase in den verschiedensten Konzentrationen, wobei diese ebenso hoch sein können wie in den entsprechenden gesunden Geweben oder sich deutlich von ihnen unterscheiden; alle Proben enthielten aber ausschließlich CK-BB.

9. In Herzinfarktseren ermöglichte die Immuntitration die quantitative Bestimmung des herzinfarktspezifischen Hybrids auch in Seren mit niedriger CK-Konzentration.

LITERATURVERZEICHNIS

ALLARD, D. & CABROL, D. (1970) Pathol. Biol. 18, 847

ANIDO, V., CONN, R.B., MENGOLI, H.F. & ANIDO, G. (1974) Amer. J. Clin. Pathol. 61, 599

BASKIN, R.J. & DEAMER, D.W. (1970) J. biol. Chem. 245, 1345

BEISENHERZ, G.H., BOLTZE, H.J., BÜCHER, T., CZOK, T., GARBADE, K.H., MEYER-ARENDT, E. & PFLEIDERER, G. (1953) Z. Naturforsch. 8 b 555

BOLL, M., BACKS, M. & PFLEIDERER, G. (1974) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 811

BULCKE, J.A. & SHERWIN, A.L. (1969) Immunochemistry 6, 681

BURGER, A., EPPENBERGER, M., WIESMANN, U. & RICHTERICH, R. (1963) Helv. physiol. acta 21, C6

BURGER, A., RICHTERICH, R. & AEBI, H. (1964) Biochem. Z. 339, 305

CAO, A., DE VIRGILIS, S. & FALORNI, A. (1968) Biol. Neonat. 13, 375

CAO, A., DE VIRGILIS, S., LIPPI, C. & COPPA, G. (1971) Enzyme 12, 49

CHETVERIKOVA, E.P. (1971) Biofizika 16, 925

CINADER, B. (1967) In "Antibodies to Biologically Active Molecules" (B.Cinader, ed.) p. 85; Pergamon Press, Oxford

DAWSON, D.M., EPPENBERGER, H.M. & KAPLAN, N.O. (1965) Biochem. Biophys. Res. Commun. 21, 346

DAWSON, D.M. & FINE, I.H. (1967) Arch. Neurol. 16, 175

DEUL, D.H. & VAN BREEMEN, J.F.L. (1964) Clin. Chim. Acta 10, 276

EPPENBERGER, H.M., VON FELLENBERG, R., RICHTERICH, R. & AEBI, H. (1962/63) Enzymol. biol. clin. 2, 139

EPPENBERGER, H.M., EPPENBERGER, M., RICHTERICH, R. & AEBI, H. (1964) Develop. Biol. 10, 1

EPPENBERGER, H.M., DAWSON, D.M. & KAPLAN, N.O. (1967) J. biol. Chem. 242, 204

FARRELL, E.C., BABA, N., BRIERLEY, G.P. & GRÜMER, H.D. (1972) Lab. Invest. 27, 209

FOCANT, B. & WATTS, D.C. (1973) Biochem. J. 135, 265

GOTO, I., NAGAMINE, N. & KATSUKI, S. (1969) Arch. Neurol. 20, 422

GOTO, I. & KATSUKI, S. (1970) Clin. Chim. Acta 30, 795

GRAIG, F.A. & SMITH, J.C. (1967) Science 156, 254

HASCHEN, R.J. (1970) in "Enzymdiagnostik" S. 187, Gustav Fischer Verlag Stuttgart

HERSCHKOWITZ, N. & CUMINGS, J.N. (1964) J. Neurol. Neurosurg. Psyciat. 27, 247

HESS, J.W., MAC DONALD, R.P., FREDERICK, R.J., JONES, R.N., NEELY, J. & GROSS, D. (1964) Ann. Intern. Med. 61, 1015

INGWALL, J.S., WEINER, C.D., MORALES, M.F., DAVIS, E. & STOCKDALE, F.E. (1974) J. cell. biol. 63, 145

JACOBS, H., HELDT, H.W. & KLINGENBERG, M. (1964) Biochem. Biophys. Res. Commun. 16, 516

JACOBS, H.K. (1974) Fed. Proc. 33, 1754

JACOBUS, W.E. & LEHNINGER, A.L. (1973) J. biol. Chem. 248, 4803

JAISLE, F. (1964) Med. Welt 3

KAR, N.C. & PEARSON, C.M. (1965) Proc. Soc. Exp. biol. med. 118, 662

KARPATI, G. & SHERWIN, A.L. (1971) J. neurol. Sci. 14, 153

KEUTEL, H.J., OKABE, K., JACOBS, H.K., ZITER, F., MALAND,F. & KUBY, S.A. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 150, 648

KIEF, W., KLEIN, B. & MÖLLER, E. (1972) Med. Klin. 67, 195

KLEINE, T.O. (1965 a) Klin. Wschr. 43, 504
(1965 b) Klin. Wschr. 43, 807

KONTTINEN, A. & SOMER, H. (1972) Amer. J. Cardiol. 29, 817

KONTTINEN, A. & SOMER, H. (1973) Brit. Med. J. 1, 386

KRZANOWSKI, J. & MATSCHINSKY, F.M. (1969) Biochem. biophys. Res. Commun. 34, 816

KUBY, S.A., NODA, L. & LARDY, H.A. (1953) Fed. Proc. 12, 234

KUBY, S.A., NODA, L. & LARDY, H.A. (1954) J. biol. Chem. 209, 191

KUMUDAVALLI, I. & WATTS, D.C. (1968) Biochem. J. 108, 547

KUMUDAVALLI, I., MORELANDS, B.H. & WATTS, D.C. (1970) Biochem. J. 117, 513

LAEMMLI, U.K. (1970) Nature 227, 680

LAURELL, C.B. (1966) Anal. Biochem. 15, 45

LEUNIS, J.C. (1973) Ann. biol. Clin. 31, 369

LIMBIRD, L.E. (1973) Thesis, University of North Carolina

LOHMANN, K. (1934) Biochem. Z. 271, 264

LOOSLI, C.G. & POTTER, E.L. (1959) Amer. Rev. Resp. Dis. 80, 5

MAKER, H.S., LEHRER, G.M., SILIDES, D.J. & WEISS, C. (1973) Exp. Neurol. 38, 295

MANCINI, G., VAERMAN, J.P., CARBONARA, A.O. & HEREMANS, J.F. (1964) In "Proc. XIth Colloquium Peptides of the biological Fluids" (H.Peeters, ed.) Elsevier, Amsterdam

MELTZER, H.Y. & GUSCHWAN, A. (1972) Life sci. 11, 121

MERCER, D.M. (1974) Clin. Chem. 20, 36

MEYERHOF, O. & LOHMANN, K. (1932) Biochem. Z. 233, 431

MORRIS, G.E., COOKE, A. & COLE, R.J. (1972) Exp. Cell. Res. 74, 582

NEUMANN, S. & PFLEIDERER, G. (1974) Biochim. biophys. Acta 334, 343

OLIVER, I.T. (1955) Biochem. J. 61, 116

OTTAWAY, J.H (1967) Nature, 215, 521

OUCHTERLONY, O. (1962) Progr. Allergy 6, 30

PATTEN, B.M. (1968) In "Human Embryology" Third. Ed. (Patten, ed.) Mc Graw-Hill Book Company,New York

PFLEIDERER, G. & JECKEL, D. (1957) Biochem. Z. 329, 370

PFLEIDERER, G. & WACHSMUTH, E.D. (1961) Biochem. Z. 334, 185

PFLEIDERER, G., DIKOW, A.L. & FALKENBERG, F. (1974) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 233

PLESCIA, O.J., BRAUN, W. & PALCZUK, N.C. (1964) Proc. Nat. Acad. Sci. 52, 279

PROCHAZKA, B. & WACHSMUTH, E.D. (1972) J. exp. Zool. 182, 201

RICHTERICH, R., SHAFROTH, P. & AEBI, H. (1963) Develop. Biol. 8, 157

ROBERTS, R., HENRY, P.D., WITTEVEEN, S.A.G.J. & SOBEL, B.E. (1974) Amer. J. Cardiol. 33, 650

ROE, C.R., LIMBIRD, L.E., WAGNER, G.S. & NERENBERG, S.T. (1972) J. Lab. Clin. Med. 80, 577

RONA, E., NAGY, A., WOLLEMAN, M. & SLOWIK, F. (1972) Neurop. pol. 10, 207

ROSALKI, S.B. (1965) Nature 207, 414

ROTTHAUWE, H.W. & KOWALEWSKI, S. (1967) Klin. Wschr. 45, 387

SAMUELS, A.J. (1963) Ann. N.Y. Acad. Sci. 103, 858

SCHULTZE, H.E. & SCHWICK, G. (1959) Clin. Chim. Acta 4, 15

SHAPIRA, F., DREYFUS, J.C. & ALLARD, D. (1968) Clin. Chim. Acta 20, 439

SHAPIRA, F. (1970) Pathol. Biol. 18, 295

SHERWIN, A.L., SIBER, G.R. & ELHILALI, M.M. (1967) Clin. Chim. Acta 17, 245

SJÖVALL, K. & VOIGT, A. (1964) Nature, 202, 701

SMITH, A.F. (1972) Clin. Chim. Acta 39, 351

SOMER, H. & KONTTINEN, A. (1972a) Clin. Chim. Acta 36, 531

SOMER, H. & KONTTINEN, A. (1972b) Clin. Chim. Acta 40, 133

SOMER, H., UOTILA, A., KONTTINEN, H. & SARIS, N. (1974) Clin. Chim. Acta 53, 369

STOREY, K.B., HOCHACHKA, P.W. (1974) FEBS Lett. 46, 337

SWANSON, P.D. (1967) J. Neurochem. 14, 343

SZASZ, G., BUSCH, E.W. & FAROHS, H.B. (1970) Dtsch. Med. Wschr. 95, 829

SZASZ, G. (1974) Dtsch. Med. Wschr. 99, 1996

TANZER, M.L. & GILVARG, G. (1959) J. biol. Chem. 234, 3201

TURNER, D.C., WALLIMAN, T. & EPPENBERGER, H.M. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 702

TURNER, D.C., MAIER, V. & EPPENBERGER, H.M. (1974) Develop. Biol. 37, 63

VAN DER VEEN, K.J. & WILLEBRANDS, A.F. (1966) Clin. Chim. Acta 13, 312

VALE, S., ESPEJEL, A., CALCANEO, F., OCAMPO, J. & DIAZ-DE-LEON, J. (1974) Arch. Neurol. 30, 103

VIAL, C., GODINOT, C. & GAUTHERON, D. (1972) Biochimie 7, 843

VIALA, B., ROBIN, Y. & VAN THOAI, N. (1970) Comp. Biochem. Physiol. 32, 401

WAGNER, G.S., ROE, C.R., LIMBIRD, L.E., ROSATI, R.A. & WALLACE, A.G. (1973) Circulation 47, 263

WARREN, W. (1973) Prep. Biochem. 3, 199

WEINHOUSE, S. (1973) Fed. Proc. 32, 2162

WOOD, T. (1963) Biochem. J. 87, 453

WOOD, T. & SWANSON, P.D. (1964) J. Neurochem. 11, 301

ZALIN, R. (1972) Biochem. J. 130, 79

ZALIN, R. (1973) Exp. Cell. Res. 78, 152

ZITER, F.A. (1974) Exp. Neurol. 43, 539

Lebenslauf

27.12.1945	Geburt in Athen/Griechenland
1951-1957	Besuch der Grundschule
1957-1963	Besuch der Deutschen Schule Athen, Dörpfeld-Gymnasium
1962	Stipendium zu einem Schulaufenthalt in der Bundesrepublik Deutschland
1963-1971	Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes zum Studium der Naturwissenschaften in der BRD
1963/1964	Ein Semester Studium der Physik an der Technischen Hochschule Fridericiana zu Karlsruhe
1964-1971	Studium der Chemie an der gleichen Hochschule
1971	Diplomarbeit: "L-Phenylalanin-Transaminasen: intrazelluläre Lokalisierung bei Lupinus angustifolius", durchgeführt unter der Anleitung von Professor Dr. E. Hasse am biochemischen Lehrstuhl des Institutes für Organische Chemie der Universität Karlsruhe
1971-1975	Dissertation im Lehrstuhl für Biochemie der Abteilung Chemie der Ruhr-Universität Bochum unter der Anleitung von Professor Dr. G. Pfleiderer über die Verteilung von Isoenzymen der Creatinkinase im Menschen

Chemoprint-Druck 63 Gießen Frankfurter Str. 131 Ruf (06 41) 2 17 12